

Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

DISSERTATION

**Biochemische und molekularbiologische
Charakterisierung von CybL und Saip, zweier dominant
apoptoseinduzierender Gene**

Eingereicht von
Volker Scherhammer

Tag der Einreichung: 23.1.2004

Erstgutachter: PD Dr. Stefan Grimm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Charles David

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Promotionsarbeit das Ergebnis meiner eigenständigen Arbeit ist, und daß ich dieses Manuskript persönlich verfasst habe. Zudem habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

München den 23.1.2004

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München, in der „Selbständigen Nachwuchsgruppe“ von Herrn PD Dr. Stefan Grimm angefertigt.

Mein erster Dank geht an PD Dr. Stefan Grimm, der mir die Möglichkeit gab in seinem Labor die vorliegende Arbeit durchzuführen, und mir durch Anleitung und Diskussionsbereitschaft tatkräftig zur Seite stand.

Weiters möchte ich mich auch bei Prof. Charles David für die Funktion als Zweitgutachter an der Ludwig-Maximilians Universität München (LMU) herzlich bedanken.

Ein weiteres „Danke“ gilt der gesamten Arbeitsgruppe (Timur Albayrak, Manuel Bauer, Erik Braziulis, Ulla Cramer, Andreas Gewies, Jasmina Putnik, Nicole Schönfeld, Alexis Schubert und Frank Voß) die durch ihre Hilfsbereitschaft, „Diskussionslaune“ zu einer angenehmen Atmosphäre im und außerhalb des Labors zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Persönlich möchte ich mich noch bei Erik B. und Andreas G. bedanken die durch ihre aufmunternde, positive Art den Laboralltag leichter gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt jedoch meinem Vater und meiner Mutter die mir durch jegliche Unterstützung überhaupt das Grundstudium ermöglicht haben; ohne Sie wäre eine Promotion nie möglich gewesen.

DANKE

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Entstehung des Begriffes Apoptose	1
1.2	Merkmale der Apoptose und Nekrose	2
1.3	Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus	4
1.3.1	Apoptose im gesunden Organismus	4
1.3.2	Fehlregulation der Apoptose	5
1.4	Caspasen	6
1.4.1	Struktur und Funktion der Caspasen	6
1.4.2	Mitglieder der Caspasen.....	8
1.4.2.1	Initiator Caspasen.....	8
1.4.2.2	Effektorcaspasen.....	9
1.4.2.3	Cytokin aktivierende Caspasen.....	9
1.4.3	Substrate der Caspasen.....	10
1.5	Apoptosesignalwege	11
1.5.1	Rezeptorvermittelte Caspasenaktivierung durch die TNF-Rezeptorfamilie - „Extrinsischer“ Signalweg.....	11
1.5.2	Der mitochondriale-“intrinsische“-Signalweg	13
1.5.2.1	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bei mitochondrial vermittelter Apoptose	15
1.6	Regulation der Apoptose	17
1.6.1	IAPs-Inhibitorproteine der Caspasen	17
1.6.1.1	Struktur und Funktion der IAPs	17
1.6.2	Die Bcl-2 Familie	18
1.7	Apoptose am endoplasmatischen Reticulum	20
1.7.1	Unfolded Protein Response (UPR).....	20
1.7.2	Calciumaustritt	21
1.7.3	Beteiligung von Caspase-12.....	22
1.7.4	Das Protein Bap31 reguliert Apoptose am endoplasmatischen Retikulum	23
2	AUFGABENSTELLUNG.....	26
3	MATERIALIEN.....	27
3.1	Chemikalien	27
3.2	Verbrauchsmaterial	29
3.2.1	Antibiotika und biochemische Reagenzien	29
3.2.2	Verbrauchsmaterial	30

3.3	Reaktionssets.....	31
3.3.1	Enzyme.....	32
3.3.2	Längen- und Molekulargewichtsstandards.....	32
3.4	Oligonukleotide.....	32
3.5	Puffer und Lösungen.....	34
3.6	Plasmide.....	36
3.7	Zelllinien und Bakterienstämme	37
3.7.1	Eukaryontische Zelllinien.....	37
3.7.2	Bakterienstämme.....	38
3.8	Zellkulturmedien.....	38
3.8.1	Medien für die Zellkultur	38
3.8.2	Medien für die Bakterienkultur	39
3.9	Antikörper	39
3.10	Verwendete Geräte.....	40
4	METHODEN.....	41
4.1	Prokaryontische Zellkultur.....	41
4.1.1	Lagerung der Bakterien.....	41
4.2	Herstellung kompetenter Bakterien	41
4.2.1	Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	41
4.2.2	Herstellung chemokompeter Bakterien	42
4.2.3	Transformation von Bakterienzellen	42
4.2.3.1	Elektrotransformation	42
4.2.3.2	Chemotransformation	43
4.3	Methoden der eukaryontischen Zellkultur.....	43
4.3.1	Kultivierung der Zelllinien.....	43
4.3.2	Lagerung und Auftauen von Zelllinien	44
4.3.3	Transfektion von Gewebekulturzellen	45
4.3.3.1	Calciumphosphatpräzipitation	45
4.3.3.1.1	Calciumphosphattransfektion mit Glycerolschock	46
4.3.3.2	Effectene-Transfektion	46
4.3.3.3	Oligofectamin-Transfektion.....	47
4.4	DNA-Methoden	48
4.4.1	Plasmidminipräparationen.....	48
4.4.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	49

4.4.3	Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten.....	49
4.4.4	Klonierung von RNAi-Konstrukten in pSUPER bzw. pSHAG-Vektorsystem.....	50
4.4.4.1	Klonierung in pSUPER Vektor.....	50
4.4.4.2	Hybridisierung ("Annealing") der Oligos.....	50
4.4.4.3	Phosphorylierung der Oligos und Ligation in den pSUPER-Vektor	50
4.4.5	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentration und Reinheit durch photometrische Messung	51
4.4.6	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....	51
4.4.7	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	52
4.4.7.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	52
4.4.7.2	Phenolextraktion	53
4.4.7.3	Markierung von cDNA-Fragmenten durch "Random priming"	53
4.4.7.4	Hybridisierung und Detektion von radioaktiv markierten Sonden.....	54
4.4.7.5	Radioaktivitätsmessung	55
4.5	RNA-Methoden	55
4.5.1	RNA-Isolierung.....	55
4.5.2	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	56
4.6	Proteinchemische Methoden	57
4.6.1	Herstellung von Gesamtzelllysaten	57
4.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	57
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
4.6.4	Nachweismethoden für Proteine	58
4.6.4.1	Coomassie-Blau-Methode	58
4.6.4.2	Ponceau S-Färbung	59
4.6.5	Blotten: Elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-Verfahren (Western-Blot).....	59
4.6.6	Nachweisreaktion: Bindung der Erst- und Zweitantikörper	60
4.6.7	Visualisierung von Proteinen mittels Chemilumineszenzreaktion	60
4.6.8	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine (GST)	61
4.6.9	Immunpräzipitation von Proteinen	62
4.6.10	Immunfluoreszenz.....	63
4.6.11	Aktivitätsmessungen der Atmungskettenkomplexe	63
4.6.11.1	Isolierung der Mitochondrien.....	63
4.6.11.2	Aktivitätsmessung von Komplex I.....	64
4.6.11.3	Aktivitätsbestimmung von Komplex II.....	65
4.6.11.4	Succinatdehydrogenasemessung (SDH)	65
4.7	Zellbiologische Methoden.....	67
4.7.1	Methoden zum Nachweis der Apoptose.....	67
4.7.1.1	DNA-Leiter.....	67
4.7.1.2	MTT-Test zur Zellzahlbestimmung	67
4.7.1.3	Nachweis hypoploider DNA	68

4.7.1.4	Caspase-3 Aktivitätsassay	69
5	ERGEBNISSE.....	71
5.1	CybL, ein Bestandteil der Atmungskette, induziert caspasenvermittelte Apoptose....	71
5.1.1	Beteiligung der Atmungskette an CybL vermittelter Apoptose	73
5.1.2	Einfluß von CybL-Expression auf Komplex I und Komplex II der Atmungskette	74
5.1.3	CybL ist neben CybS die einzige Untereinheit von Komplex II die Apoptose induziert	76
5.1.4	CybL defiziente-Zellen sind resistent gegenüber Cytostatika-induzierter und Fas-Rezeptor induzierter Apoptose	78
5.1.4.1	Vergleich von HeLa WT- und HeLa p0-Zellen in Bezug auf Cytostatikainduktion bzw. auf endogene Apoptoseregulatoren	80
5.1.5	Beteiligung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bei CybL-induzierter Apoptose	83
5.2	Identifizierung von Saip, eines dominant Apoptose induzierenden Gens.....	85
5.2.1	Primäranalyse von Saip	85
5.2.1.1	Saip als genereller Apoptose-Inducer	87
5.2.1.2	Saip induziert Caspase-abhängige Apoptose	87
5.2.2	Homologie vom Saip-Protein in unterschiedlichen Modellorganismen	89
5.2.3	Zelluläre Lokalisierung von Saip	91
5.2.4	Expression von humanen Saip	92
5.2.4.1	Nachweis von endogenem Saip in verschiedenen Zelltypen	93
5.2.5	Saip interagiert mit Bap31 am endoplasmatischen Retikulum (ER)	94
5.2.6	Hochregulation von Saip durch verschiedene Stimuli in diversen Zelllinien.....	95
5.2.7	Auswirkung der Reduktion der Genexpression von Saip auf Apoptoseinduktion	99
5.2.7.1	RNAi mit Hilfe von Expressionsplasmiden	100
5.2.7.2	Die Gen-Deaktivierung von Saip führt nach Induktion mit 5FU zur Apoptosereduktion.....	101
6	DISKUSSION.....	103
6.1	Screening nach Apoptose induzierenden Genen	103
6.1.2	Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)	104
6.1.2.1	Pathologie der oxidativen Phosphorylierung	106
6.1.3	Inhibition des Komplex II der Atmungskette durch Überexpression von CybL	107
6.1.4	Apoptoseinduktion durch CybL erfolgt nur über eine intakte Atmungskette.....	108
6.1.4.1	CybL inhibiert nur Komplex II	111
6.1.5	Die Rolle von Komplex II bei der Sauerstoffradikalbildung.....	112
6.2	Saip als Teil eines Apoptose-Sensors des Endoplasmatischen Retikulums	114
6.2.1	Saip induziert Caspase-abhängige Apoptose.....	115
6.2.1.1	Saip als genereller Apoptoseregulator	115
6.2.2	Saip interagiert am endoplasmatischen Retikulum mit Bap31 und SpikeΔN19.....	116
6.2.3	Hochregulation von Saip durch diverse Stimuli.....	119

6.2.4	RNAi, eine Methode zur Gen-Deaktivierung.....	120
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	123
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	126
9	LITERATURVERZEICHNIS	131
	LEBENS LAUF.....	160
	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	161

1 EINLEITUNG

1.1 Entstehung des Begriffes Apoptose

Die Erforschung der Apoptose hat eine lange Geschichte. Schon der römische Arzt und Schriftsteller Galenus Galen (129-199) beschrieb am Beispiel des Herzens, daß sich larvale und fötale Strukturen im Zug der Ontogenese durch programmierten Zelltod zurückbilden (Barclay 1944, Clarke 1996). Bis ins 17. Jahrhundert wurde nichts bezüglich Zelltod überliefert. Erst im 17. und 18. Jahrhundert folgten dann zahlreiche Veröffentlichungen über den Umbau von Strukturen des Herzens (Haller 1758, Harvey, 1628), und im frühen 19. Jahrhundert entdeckte Rathke (1825), daß sich auch in Säugetieren vorübergehend Kiemenbögen entwickeln, die sich jedoch während der Entwicklung des Organismus durch Zelltod zurückbilden. Auf der Basis der im fortschreitenden 19. Jahrhundert entwickelten Zellenlehre (Schleide 1842, Schwann 1839) hat Carl Vogt 1842 erstmalig den Tod von Zellen im Verlauf des Gestaltwandels von Amphibien beschrieben (Vogt 1842). Weismann prägte 1863 den Begriff „Histolyse“, und gegen Ende des 19. Jahrhunderts beschäftigte man sich hauptsächlich mit dem Zelltod in neuronalen Geweben. Basierend auf der Entdeckung der Kondensierung des Chromatins wurde der „Chromatolytische Zelltod“ definiert (Flemming 1885). Die Chromatinkondensierung gilt auch heute noch als ein wesentliches Merkmal des programmierten Zelltods. Die Vorstellung, daß Apoptose relevant für die Entwicklung des Organismus ist, entwarfen der australische Pathologe John F. R. Kerr und seine schottischen Kollegen Andrew H. Wyllie und Alastair R. Currie in einer Arbeit, die 1972 erschien (Kerr et al. 1972). Darin schreiben sie, bei dem Zellsterben während der Entwicklung und bei dem reifen Organismus handele es sich um einen gleichartigen Vorgang, der lebenslang ablaufe. Auch vermuteten die drei Forscher darin einen aktiven Prozeß, für den die betroffene Zelle selber Energie aufzubringen habe - anders als bei der Nekrose, die zum endgültigen Tod der Zelle führt. Bereits in diesem Bericht von Kerr et al. mutmaßten die Autoren, daß eine Über- oder Unterregulation der zellulären Selbstvernichtung vielleicht an mancher Krankheit beteiligt sei, zum Beispiel an Krebs. Kerr, Wyllie und Currie führten zudem auf Ratschlag

eines Mitarbeiters den Begriff Apoptose ein. Die Zusammensetzung von griechisch apo („ab, weg, los“) und ptosis („Senkung“), die ein Abfallen wie das welker Blätter bezeichnet, sollte den Unterschied zur Nekrose (abgeleitet von griechisch nekrosis für Tod, Tötung, Absterben) verdeutlichen.

Die bahnbrechende Veröffentlichung blieb allerdings in der Zell- und Molekularbiologie jahrelang unbeachtet. Mehr Aufmerksamkeit erlangten die drei Pathologen erst, als sie nach und nach die Voraussagen bestätigende Indizien fanden, etwa dafür, daß der programmierte Zelltod bis zum Lebensende von Tier und Mensch weitergeht und das eine Entgleisung mit Krebs einhergehen kann. Mit dem Fadenwurm *Caneorhabditis elegans* (*C.elegans*), einem Modellorganismus, gelang schließlich der Durchbruch, in dem die genetischen Komponenten die für den Zelltod verantwortlich sind, identifiziert werden konnten. Der Nematode besitzt zu Beginn seiner Entwicklung über 1000 somatische Zellen, von denen im Rahmen der Ontogenese 131 durch Apoptose entfernt werden und das adulte Tier entstehen lassen. Dieser programmierte Zelltod eröffnet die Möglichkeit definierte Strukturen zu konstruieren oder zu entfernen (Ellis et al. 1986).

1.2 Merkmale der Apoptose und Nekrose

Der physiologische Zelltod ist nicht zu verwechseln mit der Nekrose. Bei diesem Vorgang gehen Gewebe infolge einer mechanischen Verletzung oder einer anderen irreparablen Schädigung - auch durch Sauerstoffmangel bedingt - zugrunde. Unter dem Mikroskop ist eine dafür typische Schwellung zu erkennen, die auftritt, weil Organellen wie insbesondere Mitochondrien und die Zelle selbst an Volumen zunehmen und zerplatzen. Zugleich ist ein entzündlicher Prozess für Nekrosen charakteristisch: Im Organismus umherwandernde Immunzellen sammeln sich an den geschädigten Körperzellen und phagozytieren diese. An sich hilft die damit einhergehende Entzündung, einen Infektionsherd zu begrenzen und anfallende Zelltrümmer zu entfernen; doch können die Immunzellen und die von ihnen abgegebenen Stoffe mitunter auch gesundes Gewebe erheblich schädigen.

Hingegen stellt sich die Apoptose ganz anders dar. Dabei tritt bemerkenswerterweise keine Schwellung auf; vielmehr schrumpft die Zelle und löst sich von den anderen Zellen ab. Auf der Oberfläche bilden sich Bläschen (*Membran-Blebbing*), in weiterer Folge kommt es zur Ausbildung von sogenannten „apoptotischen Körperchen“ (Zellstrukturen, welche

Zytoplasma, Organellen und Chromatin beeinhalten). Organellen behalten noch ihre Struktur, nur der Zellkern - dessen Erscheinungsbild sich bei der Nekrose kaum verändert - bekommt ein völlig neues Aussehen. Besonders auffällig ist das Kondensieren des normalerweise homogen im Kern verteilten Chromatins, also der DNA mit den daran gebundenen Proteinen, zu einem oder mehreren deutlich sichtbaren Klümpchen in der Nähe der Kernhülle, gefolgt von der biochemisch charakteristischen Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen (Arends et al. 1990; Raff 1992; Peitsch et al. 1994). Häufig wird eine apoptotische Zelle schon in diesem Stadium von Zellen in ihrem Umfeld aufgenommen und abgebaut, ohne daß eine Entzündungsreaktion einsetzt (Voll et al. 1997).

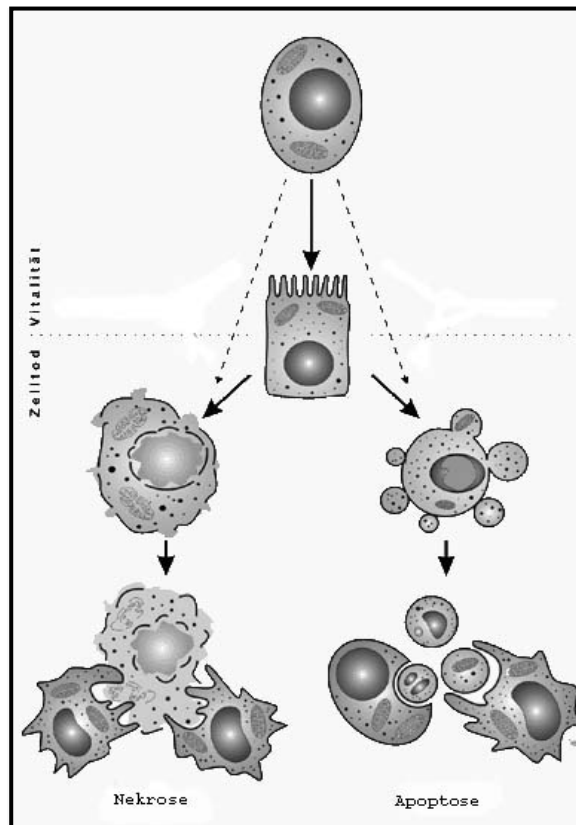


Abb. 1.1

Schematische Darstellung von Nekrose und Apoptose. Die Abbildung zeigt die strukturellen Veränderungen der Zelle während der Apoptose und Nekrose. Charakteristisch für die frühe Apoptose ist das Schrumpfen der Zelle, die Kondensation des Zytoplasmas und des Chromatins und die Einstülpung des Zellkerns. In der späteren Phase erfolgt die nukleäre Fragmentierung, und die Desintegration der Plasmamembran führt zur Bildung apoptotischer Körperchen, die durch Makrophagen phagozytiert und in Lysosomen verdaut werden. Bei der Nekrose kommt es zur völligen Zerstörung der Plasmamembran, die Zellinhalte werden in die Blutbahn abgegeben, gelangen in Organe und/oder Gewebe und leiten damit eine entzündliche Reaktion ein (Trump et al. 1967; Lockshin et al. 1981).

1.3 Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Apoptose ist als grundlegender biologischer Prozeß weit verbreitet, und Komponenten der apoptotischen Maschinerie findet man bei Cnidariern, Nematoden, Insekten, Fischen, Säugetieren und sogar in Pflanzen (Aravind et al. 1999; Cikala et al. 1999; Inohara et al. 2000). Diese evolutionäre Konserviertheit der Apoptose ist ein Indiz für die Notwendigkeit des gesteuerten Zelltods sowie für das Entstehen und Überleben von Organismen.

1.3.1 Apoptose im gesunden Organismus

Im Verlauf der Ontogenese dient der programmierte Zelltod der Entfernung überflüssiger, störender Zellen, die im Laufe der Entwicklung eines Organismus entstehen können. Er ist somit für die Strukturbildung von essentieller Bedeutung: Beispielsweise wird die Gastrulation des frühen Embryos durch den regulierten Tod von Zellen im Innern der Blastula ermöglicht (Joza et al. 2001). Ein weiteres Beispiel ist die Entstehung des Augenbechers, der Augenlinse oder des Neuralrohrs durch Ablösung vom umliegenden Gewebe. Ebenso werden die freistehenden Finger und Zehen des Menschen, die in der frühen Embryogenese, ähnlich wie bei Vögeln, durch Zwischengewebe („Schwimmhäute“) verbunden sind, durch programmierten Zelltod hervorgebracht (Milligan et al. 1997; Meier et al. 2000). Auch die Entwicklung des Gehirns und des Immunsystems wird ermöglicht, indem eine Vielzahl von Zellen gebildet werden, von denen schließlich nur die gesunden überleben. Bei Katzen zum Beispiel sterben bis zu 80% der Ganglionzellen der Retina kurz nach der Geburt ab, da es ihnen nicht möglich ist, zu den umliegenden innervierenden Zellen Kontakt herzustellen, welche eine Versorgung und somit ein Überleben gewährleistet (Meier et al. 2000). In der humanen Embryonalentwicklung wird der Müller'sche bzw. Wolff'sche Gang, aus dem später Uterus, Ovidukt bzw. die männlichen Geschlechtsorgane hervorgehen werden, angelegt, und durch Apoptose wieder eliminiert. Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der Apoptose ist der Steroidhormon-gesteuerte Ab- und Umbau von Geweben am Ende der Menstruation, Schwangerschaft oder Laktation (Gosden et al. 1997).

1.3.2 Fehlregulation der Apoptose

Das Entfernen von verletzten und entarteten Zellen verhindert den Ausbruch von Krankheiten und entzündlichen Prozessen. Dabei kann sich – je nach Kontext – sowohl ein Übermaß als auch ein Mangel als nachteilig erweisen. Funktionelle Defekte, die eine unnatürliche Verstärkung apoptotischer Prozesse und somit einen Anstieg der Zelltodrate bewirken oder dazu führen, daß zuwenig Zellen sterben, sind unter anderem an der Entstehung neurodegenerativer und neuromuskulärer Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson beteiligt (Thompson 1995; Kroemer et al. 1997). Auch bei AIDS und Infarkten kann Apoptose zum Krankheitsbild beitragen, indem zu viele Zellen absterben (siehe Tab. 1.1). Sind durch Apoptose wesentliche Komponenten des Immunsystems geschwächt, kann es zu vermehrten Infektionen, beispielsweise mit Herpes- oder Adenoviren, kommen (Thompson 1995; McLaughlin et al. 2001). Dagegen führt eine Reduktion der Apoptoserate zu einem Ansammeln überflüssiger Zellen. Krebs ist zum Beispiel eine mögliche Folge reduzierter Apoptose. Häufig werden Tumorzellen durch Apoptose aus dem Organismus entfernt, so daß es gar nicht zur Ausbildung und Metastasierung von Tumoren kommt. Werden jedoch die geschädigten Zellen als Folge einer erniedrigten Apoptoserate, zum Beispiel durch Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 nicht entfernt, steigt die Wahrscheinlichkeit der Tumorbildung. Es konnte gezeigt werden, daß in 50% aller Tumoren das p53 Gen mutiert ist (Liu et al. 2002). Dadurch werden auch geschädigte Zellen nicht mehr effizient aus dem Körper entfernt, und es kommt zur Ausprägung von Tumoren (Kroemer et al. 1997). Aber auch bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. Systemischer Lupus erythematosus, kommt es durch nicht ausreichende Entfernung autoreaktiver Lymphozyten, zum Krankheitsbild (Watanabe-Fukunaga et al. 1992; Bouillet et al. 1999).

Immer mehr Hinweise aus den letzten 10 Jahren deuten verstärkt darauf hin, daß genetische Defekte, welche die Fähigkeit der Apoptoseinduktion beeinträchtigen, für die Entstehung und das Ausbreiten von Tumoren notwendig sind (Zornig et al. 2001). Die Vermehrung eines transformierten Klonen wird nicht nur durch dessen erhöhte Proliferationsrate erreicht, sondern wird auch in sehr starkem Maße durch eine verringerte Apoptoserate begünstigt. Studien an Mausmodellen oder Analysen verschiedener Stadien humaner Tumore zeigen, daß eine Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion für die Bildung der meisten, wenn nicht sogar aller Tumore entscheidend ist (Strasser et al. 1990; Strasser et al. 1997; Hanahan et al. 2000; Jaattela 2002).

Krankheiten mit erniedrigter Apoptoserate	Krankheiten mit erhöhter Apoptoserate
Krebs mit p53 Mutationen	AIDS (<u>A</u> quired <u>I</u> mmuno- <u>D</u> eficiency <u>S</u> ndrome)
Hormonabhängige Tumore, z.B.	Neurodegenerative Erkrankungen z.B.
Brustkrebs, Prostatakrebs, Krebs der Eierstöcke	Alzheimer, Parkinson, Retinitis pigmentosa
Autoimmunerkrankungen	Schlaganfall
Virale Infektionen	Alkoholismus

Tab. 1.1 Beispiele für Erkrankungen mit erniedrigter und erhöhter Apoptoserate

1.4 Caspasen

Der Verlust des *C.elegans*-Gens *ced-3* führt im Fadenwurm zum Überleben aller 131 Zellen, die normalerweise im Laufe der Entwicklung durch Apoptose entfernt werden (Ellis et al. 1986). Interessanterweise stellte sich heraus, daß *ced-3* homolog zu einer humanen Protease ist, dem Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE). Mittlerweile umfasst die Familie der ICE/Ced-3-Homologa 14 Mitglieder in Säugetieren. Es handelt sich um Cysteinproteasen, die Substrate innerhalb einer spezifischen Tetrapeptidsequenz C-terminal von einem **A**sparat-Rest schneiden, und deshalb unter dem Namen Caspasen zusammengefasst werden (Nicholson et al. 1997; Kumar 1999).

1.4.1 Struktur und Funktion der Caspasen

Caspasen werden als so genannte Zymogene (Procaspasen) synthetisiert, die eine sehr geringe intrinsische enzymatische Aktivität haben. Das vollständige aktive Enzym ist ein Heterotetramer und besteht aus zwei identisch großen ca. 20 kDa Untereinheiten und zwei Untereinheiten von 10 kDa Größe (Walker et al. 1994; Wilson et al. 1994; Rotonda et al. 1996).

Einige Caspasen, vorwiegend Effektorcaspasen (siehe Abschnitt 1.4.2.2), schneiden und inaktivieren zelluläre Proteine, wie zum Beispiel DNA-Reparaturenzyme, Lamin, Gelsolin, MDM2 (Inhibitor von p53) und Proteinkinase C (Thornberry et al. 1998). Aber es gibt auch Enzyme die direkt oder indirekt durch Caspasen aktiviert werden können (vgl. Abschnitt

1.4.3). Caspase-3 zum Beispiel kann eine negative regulatorische Domäne von der p21-Kinase aktivierten Proteinkinase (PAK2) entfernen und leitet das „Membranblebbing“ ein. Weitere Apoptoseinhibitoren, die von Caspasen prozessiert werden, sind Bcl-2 Proteine-antiapoptotische Proteine (siehe Abschnitt 1.6.2). Es scheint sogar, daß diese Proteine durch Caspase-vermittelte Proteolyse nicht nur inaktiviert werden, sondern daß die resultierenden Fragmente sogar proapoptotische Eigenschaften haben (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L), die zu einer weiteren Amplifikation des Apoptosesignals beitragen (Adams et al. 1998; Cheng et al. 2001).

Jede lebende Zelle exprimiert konstitutiv Caspasenvorläufermoleküle (Procaspasen), deren Aktivierung innerhalb kürzester Zeit zu einer exponentiellen Verstärkung des apoptotischen Signals führen kann. Da bereits die Aktivierung einzelner Effektorcaspasenmoleküle unausweichlich den Tod der gesamten Zelle bewirkt, ist ein Regulationssystem notwendig, das in seiner Komplexität dem der Blutgerinnung oder des Komplementsystems vergleichbar ist (Thornberry et al. 1998).

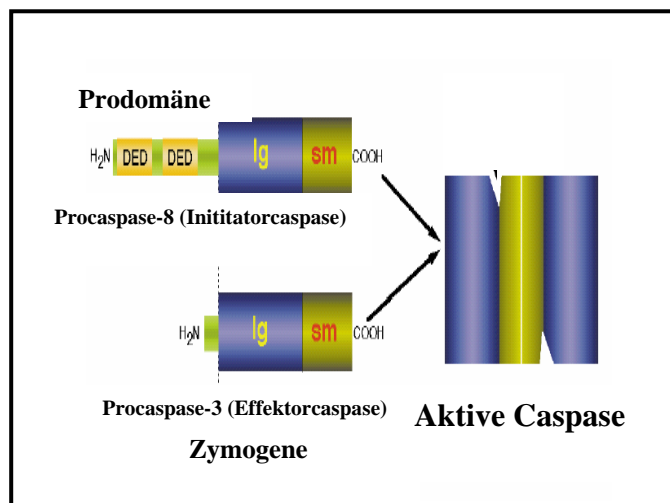


Abb. 1.2

Struktur und Aktivierung von Caspasen. Die Abbildung zeigt die Struktur der Zymogene für Caspase-8, eine Initiatorcaspase und Caspase-3, eine Effektorcaspase. Die aminoterminalen Prodomänen sind grün eingefärbt und die großen Untereinheiten blau. Die Prodomäne von Caspase-8 beinhaltet zwei Death Effector Domänen (DED). Andere Caspasen besitzen stattdessen ein CARD (Caspase recruiting domain) Domäne. Das Heterotrimer Enzym (rechts) resultiert aus dem proteolytischen Weg der Caspasenaktivierung (Thornberry et al. 1998).

1.4.2 Mitglieder der Caspasen

1.4.2.1 Initiator Caspasen

Die Initiatorcaspasen spielen in der Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle. Die Signaltransduktion, die in die Aktivierung von Caspasen mündet, muss deswegen präzise reguliert sein. Bisher sind zwei prinzipielle Wege bekannt: Der "extrinsische" Aktivierungsweg über Plasmamembranrezeptoren und der "intrinsische" oder mitochondriale Weg, die im Abschnitt 1.5.1 bzw. 1.5.2 näher beschrieben werden.

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen wird durch Adaptorproteine erreicht, die über DED's (Death Effector Domain - für Caspase-8 und -10) oder CARD (Caspase recruiting domain - zwischen Caspase-9 und Apaf-1) die Brücke zu den Apoptoserezeptoren bilden.

Über homotypische DED:DED Interaktionen interagiert beispielsweise Procaspase-8 mit Adaptorproteinen von zelltodvermittelnden Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Superfamilie (TNF-R) (siehe Abschnitt 1.5.1) und vermittelt „extrinsische“ (extrazelluläre) Todessignale durch autokatalytische Aktivierung und sukzessive Spaltung von Effektorcaspasen. *In vitro* wurde gezeigt, daß Caspase-8 die Caspasen-3, -4, -7, -9 und -10 direkt spalten kann. Die Caspasen-2 und -6 werden bei diesem Signalweg zwar auch gespalten und aktiviert, jedoch nicht direkt durch Caspase-8, sondern durch andere, später aktivierte Caspasen (Muzio et al. 1996; Luo et al. 1998; Krammer 2000; Strasser et al. 2000). In vielen Modellorganismen (z.B. *C.elegans*) in denen Caspase-8 und -10 exprimiert werden, scheinen sie aufgrund der großen Identität (48%) und Substratspezifität redundant zu sein. Trotzdem ist in Caspase-8 Knockout-Mäusen (Kischkel et al. 2001) der Phänotyp lethal und lässt vermuten, daß entweder Caspase-8 und -10 sich gegenseitig während der Entwicklung komplementieren, unterschiedlich stark exprimiert werden, oder daß Mäuse keine Caspase-10 haben (Hakem et al. 1998; Kuida et al. 1998; Varfolomeev et al. 1998).

1.4.2.2 Effektorcaspasen

Im Vergleich zu den Initiatorcaspasen bestehen die Caspasen-3, -6 und -7 aus unterschiedlich langen N-terminalen Aminosäurenresten (23-28 aa).

Die Gründe, warum es drei Effektor-Caspasen gibt, sind bis heute noch unklar. Caspase-3 zum Beispiel, spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung (Kuida et al.1996). Mittels Caspase-3 *Knockout*-Mäusen konnte festgestellt werden, daß diese Mäuse bei der Geburt wesentlich kleiner als ihre Artgenossen sind, und 1-3 Wochen später sterben; ein Hinweis dafür, daß Caspase-3 schon in der frühen Phase der Entwicklung eine wesentliche Rolle spielt. Caspase-6 defiziente-Mäuse hingegen zeigen keinen Phänotyp. Der Phänotyp von Mäusen bei denen Caspase-7 ausgeschaltet wurde, konnte bisher noch nicht gezeigt werden, jedoch sind sich Caspase-3 und -7 in ihrer Substrat- und Inhibitorspezifität sehr ähnlich. Viele Experimente zeigen jedoch, daß Caspase-6 und -7 abwärts („downstream“) von Caspase-3 aktiviert werden (Orth et al. 1996) (Ali et al. 1999).

1.4.2.3 Cytokin aktivierende Caspasen

Zu den Cytokinaktivierenden Caspasen konnte bisher noch kein Zusammenhang mit Apoptose nachgewiesen werden. Diese Caspasen aktivieren wahrscheinlich nur Cytokine als Antwort auf inflammatorische Reaktionen.

Caspasen-1, -4, -5, -11, -12, -13 und -14 gehören zu den Cytokin-aktivierenden Caspasen. Obwohl Caspase-1 keinen direkten Bezug zur Apoptose hat, war Caspase-1 das erste Mitglied der großen Proteasenfamilie das identifiziert werden konnte. So können zum Beispiel Caspase-1 defiziente-Mäuse kein Pro-IL β bilden. Dies hat zur Folge, daß diese Mäuse resistent gegen septischen Schock sind und andere Cytokine (IL-1 α , IL-6, TNF- α , Interferon δ) in geringerer Menge produziert werden (Li et al. 1995; Kuida et al. 1996).

Obwohl die Caspasen-4 und -5 bisher noch zu wenig untersucht worden sind, wird angenommen, daß sie aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie in die Gruppe der cytokinaktivierenden Caspasen einzuordnen sind. Wahrscheinlich produzieren Caspase-4 und -5 Cytokine als Antwort auf diverse entzündliche Stimuli oder kooperieren mit Caspase-1.

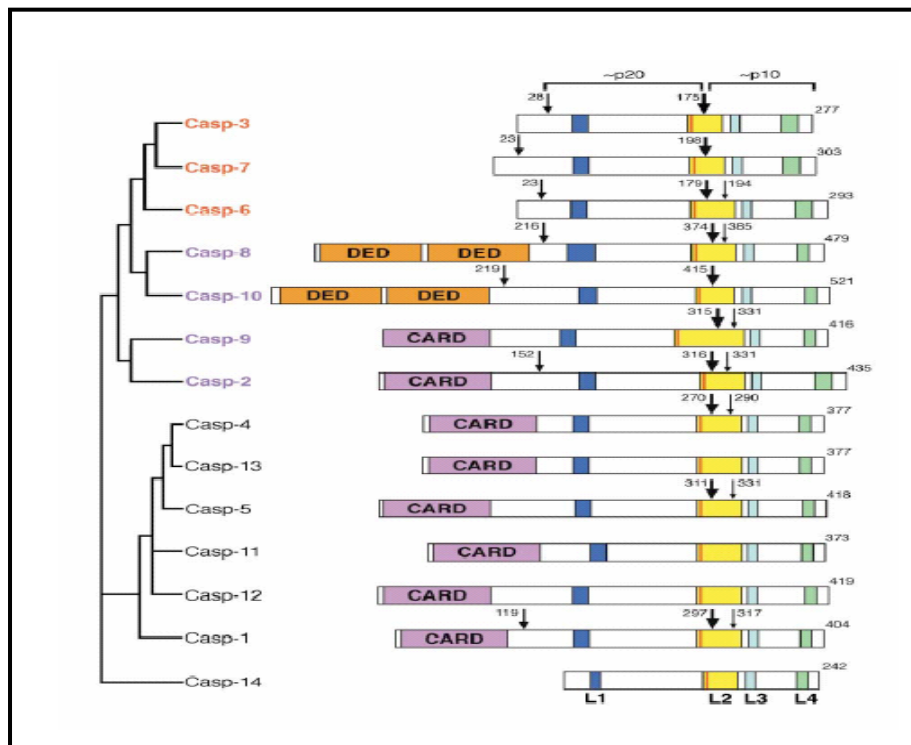


Abb. 1.3

Schematische Darstellung der Säugetiercaspasen. Mit Ausnahme der Caspase-11 (Maus), Caspase-12 (Maus) und Caspase-13 (Rind) sind alle aufgelisteten Caspasen humanen Ursprungs. Die Initiatorcaspasen sind (Lila), die Effektorcaspasen (rot) und die Cytokinaktivierenden Caspasen markiert. Die Position der ersten Aktivierungsschnittstelle (zwischen der großen und der kleinen Untereinheit) ist mit einem dicken Pfeil markiert, zusätzliche Schnittstellen sind mit kleineren Pfeilen gekennzeichnet. Die vier Oberflächen-„Loops“ die die katalytische Stelle formen, sind mit L1-L4 angeführt (Shi 2002).

1.4.3 Substrate der Caspasen

Inzwischen ist eine Reihe von verschiedenen Substraten bekannt, die von Caspasen spezifisch gespalten werden (Kaufmann et al. 2001). Bei einigen Substraten führt die Prozessierung zur funktionellen Inaktivierung des betroffenen Proteins, während andere, wie z.B. die Caspasen selbst, erst durch Spaltung aktiviert werden. Aktivierte Caspasen sind vermutlich für die meisten typischen, mit Apoptose einhergehenden, morphologischen Veränderungen verantwortlich (siehe Abb. 1.1), indem sie zellinterne Strukturen (wie z.B. den Zellkern) auflösen. Die hauptsächlich aus Laminpolymeren bestehende Kernlamina ist eine strukturgebende Intermediärfilamentschicht, die an der Chromatinorganisation beteiligt ist. Die Spaltung des Lamins durch Caspasen während der Apoptose führt zum Zusammenbruch der Kernlamina und trägt zur Chromatinkondensation bei (Orth et al. 1996; Takahashi et al.

1996; Thornberry et al. 1998). Neben der Desintegration von Zellstrukturen beeinflussen aktivierte Caspasen eine Vielzahl biochemischer Prozesse. So inaktivieren oder deregulieren sie Proteine, die an der DNA-Reparatur (z.B. DNA-PK_{CS}, PARP), mRNA-Spleißen (U1-70K) oder DNA-Replikation (Replikationsfaktor C) involviert sind. (Lazebnik et al. 1994; Cryns et al. 1996; Song et al. 1996). Eine weitere Aufgabe der Caspasen ist die Inaktivierung von Proteinen, welche die Zelle vor Apoptose schützen. Die Caspase aktivierte DNase (CAD) ist durch die Bindung an den Inhibitor ICAD normalerweise inaktiviert (Liu et al. 1997; Enari et al. 1998). Während der Apoptose wird ICAD durch Caspasen geschnitten und führt zur Aktivierung der Endonuklease (CAD), welche die für die Apoptose charakteristische DNA-Leiter verursacht (Nagata 2000).

1.5 Apoptosesignalwege

1.5.1 Rezeptorvermittelte Caspasenaktivierung durch die TNF-Rezeptorfamilie - „Extrinsischer“ Signalweg

In Säugetieren wurden bisher verschiedene Apoptosewege beschrieben. Da die zelltodvermittelnden Rezeptoren bzw. die Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Apoptose spielen, werden im folgenden zwei der wichtigsten Apoptosewege beschrieben. Der Erste ist der so genannte „death receptor pathway“ („Extrinsische“) und wird durch Mitglieder der TNF- (Tumor necrosis family) Familie wie TNF, FasL/CD95L, TWEAK und TRAIL ausgelöst (Krammer 2000; Locksley et al. 2001). Der andere ist der „Intrinsische Weg“ (siehe Abschnitt 1.5.2), in dem Caspase-9 involviert ist, die abwärts von den mitochondrialen proapoptotischen Ereignissen aktiviert wird, und das so genannte Apoptosom, ein zytosolischer apoptoseinduzierender Komplex bildet (Salvesen et al. 2002).

Die am besten charakterisierten Rezeptoren, die „Zelltod-Rezeptoren“, sind der TNF-Rezeptor I (TNFR1/TNFRSF1A/p55/CD120a) und der Fas- (TNFRSF6/APO-1/CD95) Rezeptor (Ashkenazi et al. 1998; Locksley et al. 2001). Die Mitglieder der TNFR-Familie bestehen aus cysteinreichen, extrazellulären Subdomänen, die den Liganden mit hoher Spezifität erkennen. Die Weiterleitung des apoptotischen Signals erfolgt über Trimerisierung durch den zytoplasmatischen Teil des Todesrezeptors über die so genannte *Death effector domain* (DED) (Kaufmann et al. 2001). An die aktivierten Rezeptoren werden über die DED

verschiedene DED-enhaltende Adaptorproteine durch Protein-Proteininteraktionen rekrutiert, an die wiederum weitere zytoplasmatische Faktoren binden können, so daß ein todesinduzierender Signalkomplex (Death inducing signaling complex - DISC) entsteht. Das Adaptormolekül besitzt ebenfalls eine DED die durch DED-DED Interaktionen die Procaspase-8 an den DISC-Komplex bindet. Dies führt zur autokatalytischen Aktivierung von Procaspase-8 und der Effektorcaspasen, das schlussendlich zum Zelltod führt. Rezeptoren, die diese Domäne nicht besitzen, die so genannten Decoy-Rezeptoren (DcR), modulieren die Apoptose-Antwort indem sie die Todes-Liganden binden aber keinen Zelltod auslösen. Der DcR-3 (bindet den Fas-Liganden) ist in ca. 50% der primären Lungen- und Darmtumoren überexprimiert und desensitiviert wahrscheinlich die Krebszellen gegenüber Fas-induzierter Apoptose (Pitti et al. 1998). Die DED-enhaltenden Rezeptoren sind in der Lage, durch homotypische Interaktionen Apaptormoleküle wie TRADD (TNF-R-associated death domain) und FADD (Fas-associated death domain) zu rekrutieren (Boldin et al. 1995; Chinnaiyan et al. 1996). Die DISC-Zusammensetzung ist variabel und dabei abhängig von Rezeptor- und Zelltyp (Chinnaiyan et al. 1995; Whitlock et al. 2000).

Der Art der Aktivierung kann durch Inhibitorproteine verhindert werden. Diese Proteine werden FLIPs genannt: Fas assoziierte Todesdomänen-ähnliche ICE-Inhibitorproteine. Neben zweier funktionell identischer Isoformen zellulärer c-FLIPs kodieren eine Anzahl von Viren v-FLIP als Teil ihrer Überlebensstrategie (Thome et al. 1997; Zornig et al. 2001). Aufgrund ihrer zwei DEDs und ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Caspase-8 sind sie in der Lage, Caspase-8 am Rezeptorkomplex zu ersetzen. Da sie jedoch wegen Fehlens eines funktionellen Cysteins in ihrer caspase-ähnlichen Domäne, trotz Spaltung in p18 und p10, keine proteolytische Aktivität besitzen, blocken sie effektiv die rezeptorvermittelte Apoptose (Scaffidi et al. 1999). Die innerhalb des DISC aktivierte Caspase-8 ist der Ausgangspunkt für den weiteren Signalweg. Dabei ist eine Abhängigkeit vom Zelltyp zu erkennen. In den so genannten „Typ I Zellen“ kann die Caspase-8 Caspase-3 direkt aktivieren. In den anderen Zelltypen, die unter „Typ II“ zusammengefasst werden, ist an den DISC-Komplex nur sehr wenig Procaspase-8 gebunden, die nicht ausreicht, um Procaspase-3 direkt zu aktivieren.

In den Typ II Zellen prozessiert Caspase-8 ein verkürztes Fragment der proapoptotischen Familie Bcl-2 (tBid) (siehe Abschnitt 1.6.2). Dieses 15 kDa große Fragment wandert an die äußere Mitochondrienmembran, und induziert dort die Freisetzung proapoptotischer Faktoren (Gross et al. 1999). Versuche mit Bid Knockout-Mäusen haben gezeigt, wie wichtig Bid für

die Apoptose ist. Mäusen, denen Bid fehlt, reagieren nicht mehr auf Stimulierung mit TNFR-Rezeptoren oder auf den Fas-Liganden (Li et al. 1998).

1.5.2 Der mitochondriale - "intrinsische" - Signalweg

Der erste Hinweis, daß Mitochondrien essentiell für die Auslösung von Apoptose sind, wurde 1994 von Newmeyer und Mitarbeitern gezeigt, in dem sie zeigten, daß für Apoptose die Freisetzung zahlreicher proapoptotischer Faktoren notwendig ist (Newmeyer et al. 1994).

Im Verlauf der Aktivierung von Mitochondrien kommt es zur Freisetzung von Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma, wo diese ihre Wirkung entfalten. Diese Freisetzung erfolgt entweder direkt über Kanäle, die von aktivierten Bax- oder Bak-Oligomeren gebildet werden, oder indirekt durch die Bax- oder Bak-induzierte Öffnung der PT-Poren (permeability transition pore), die beide mitochondriale Membranen durchziehen. Infolge der PT-Porenöffnung kommt es zu einem Ionenstrom zwischen Zytoplasma und mitochondrialer Matrix und damit zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$). Die Folge ist ein osmotischer Wassereinstrom, der zum Anschwellen und Platzen der Organellen führt, wodurch proapoptotische Faktoren freigesetzt werden. Von besonderer Bedeutung sind dabei Cytochrom c, der Apoptose induzierende Faktor AIF, Smac/DIABLO, welches antiapoptotische zytoplasmatische Proteine (IAPs) inhibiert, die Procaspasen-2, -3 und -9 sowie Ca^{2+} -Ionen, die die Aktivierung von Caspasen und Nukleasen begünstigen (Kroemer et al. 1995; Petit et al. 1997; Green 1998; Cassarino et al. 1999; Loeffler et al. 2000).

Durch den Verlust an Cytochrom c ist die Funktion der mitochondrialen Elektronentransportkette zwischen Komplex III und IV gestört. Es werden vermehrt Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, so daß reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) entstehen, (siehe dazu Abschnitt 1.5.2.2) insbesondere Superoxidanionen, die weitere Schäden wie die Oxidation von Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren hervorrufen können (Zamzami et al. 1995; Cai et al. 1998).

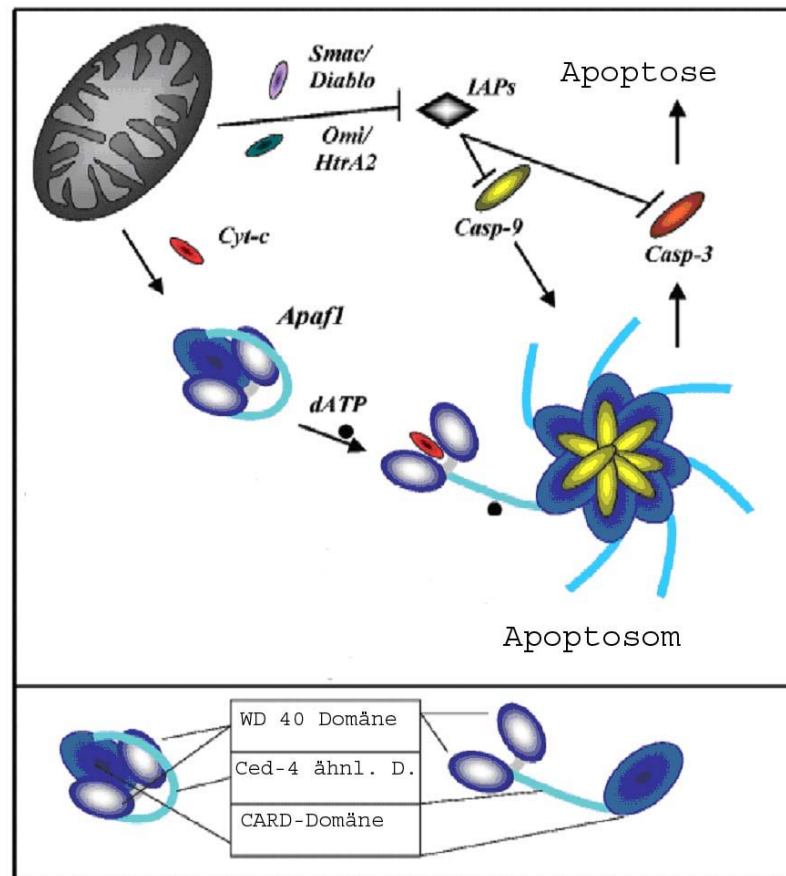
Wichtiger noch ist die Fähigkeit von Cytochrom c, nachdem es in das Zytoplasma gelangt ist, zusammen mit dATP und/oder ATP die Oligomerisierung und Aktivierung der Procaspase-9 zu bewirken. Dadurch entsteht ein funktionelles „Apoptosom“, in dem der Komplex aus

Procaspase-9 und dem Adaptormolekül Apaf-1 – vermittelt durch das ebenfalls freigesetzte Smac/DIABLO – von dem inhibitorischen XIAP befreit wird (siehe Abschnitt 1.6.1.1)

(Liu et al. 1997; Adams et al. 1998; Srinivasula et al. 2001). Durch die induzierte räumliche Annäherung bewirkt die geringe Basalaktivität der Procaspase-9 Moleküle deren gegenseitige Aktivierung. Es entsteht aktive Caspase-9, die weitere Caspasen aktiviert und auf diese Weise die proapoptotische Kaskade vorantreibt (Slee et al. 1999).

Auch die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors AIF trägt zur Apoptose bei. AIF ist ein Protein, das in den Kern transloziert und dem, unabhängig von Caspasen, eine zentrale Rolle bei der gezielten Degradierung zellulärer Komponenten zukommt (Green et al. 1998; Susin et al. 1999; Loeffler et al. 2000; Joza et al. 2001). Der Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Zytoplasma aktiviert Ca^{2+} -abhängige Enzyme wie Gewebetransglutaminasen, die zelluläre Proteine quervernetzen und auf diese Weise die unkontrollierte Freisetzung von Zellkomponenten verhindern. Auch Endonukleasen werden durch den Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration aktiviert, der nicht nur durch Freisetzung aus den Mitochondrien, sondern auch durch Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Reticulum und durch Ca^{2+} -Influx aus dem extrazellulären Raum bedingt sein kann (Bellomo et al. 1992). Voraussetzung für die Aktivierung ist jedoch, daß die Nukleasen zusätzlich von ihrem Inhibitor ICAD befreit werden, indem dieser durch Caspasen gespalten wird. Die so aktivierten Nukleasen zerlegen die chromosomale DNA der Zelle durch internukleosomale Spaltung in Fragmente (Cohen et al. 1984; McConkey et al. 1989; Arends et al. 1990).

Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (Lane 1992; Carson et al. 1995). Möglicherweise tragen sie auch zur Bildung der apoptotischen Körperchen bei (Fesus et al. 1989; Martin et al. 1994). Auch Effektor-Caspasen können Mitochondrien für die Apoptoseinduktion aktivieren: Beispielsweise aktiviert das von zytotoxischen T-Lymphocyten ausgeschüttete Granzym B, nachdem es in die Zielzelle gelangt ist, u.a. Caspase-3, welche über einen noch unbekannten Mechanismus die Aktivierung der Mitochondrien bedingt (Kagi et al. 1994).

**Abb. 1.4**

Schematische Darstellung des Apoptosoms. Der intrinsische Weg der Caspasenaktivierung erfolgt über die Freisetzung von Cytochrom c durch die Mitochondrien. Apaf-1 wird durch ATP aktiviert und bildet das so genannte Apoptosom. Diese Struktur bindet einige Moleküle der Caspase-9 über CARD/CARD Interaktionen. Dadurch wird die lokale Konzentration der Procaspase-9 erhöht. Die treibende Kraft der Caspase-9-Aktivierung ist dessen Dimerisierung die durch das Apoptosom katalysiert wird (Denault et al. 2002).

1.5.2.1 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bei mitochondrial vermittelter Apoptose

Studien in den frühen 70-iger Jahren haben bewiesen, daß Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Produktion von ROI spielen (Boveris et al. 1973).

Die Mitochondrien sind die Hauptproduzenten von Sauerstoffintermediaten und häufig an apoptotischen Prozessen beteiligt (Hengartner 2001a; Hengartner 2001b). Superoxid ist das primäre Sauerstoffradikal, das von den Mitochondrien wahrscheinlich durch einen nichtenzymatischen Mechanismus gebildet wird: Das Ubisemiquinon, das in der Atmungskette gebildet wird, überträgt Elektronen auf den Sauerstoff und sorgt damit für eine

konstante Quelle von Superoxiden (Fridovich 1995). Diese Oxide können die Eisenschwefelzentren in Enzymen wie Succinatdehydrogenase, mitochondriale NADH-Ubichinon Reduktase aufgreifen und zerstören die katalytische Funktion (Gardner et al. 1995; Flint et al. 2000).

Superoxide werden durch ein Enzym, die Superoxiddismutase, schnell durch die Umwandlung in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entfernt. Es gibt drei Superoxiddismutasen in Säugetieren: Eine zytosolische Superoxiddismutase (SOD1), eine intramitochondriale Mangan-Superoxiddismutase (SOD2) und eine extrazelluläre CuZn-Dismutase (SOD3) (Fridovich 1995). Ubichinol von Komplex I oder II produziert, wird von Komplex III oxidiert, dabei werden die Elektronen durch Reaktionen mit Cytochrom B, Eisen-Schwefelprotonen und Cytochrom c_1 auf Cytochrom c oxidiert (Trumpower 1990). Blockiert man Komplex I durch Antimycin, so wird dadurch verhindert, daß das Semiquinon die Elektronen weitergibt und es kommt durch Komplex II zur Überproduktion von Sauerstoffradikalen (Raha et al. 2000). Diese Überproduktion findet an der Matrixseite der Mitochondrienmembran statt, führt zur Schädigung in Komplex I und Succinatdehydrogenase und zu einer verminderten ATP- und Laktatproduktion mit diversen Krankheitsbildern (Lebovitz et al. 1996). Durch die verminderte ATP-Produktion kommt es zur Verzögerung in der Aktivierung der Caspasen, weil dafür ATP benötigt wird, und die Zellen sterben nekrotisch. Es gibt auch Hinweise, daß ROI sehr schnell nach Fas-Aktivierung gebildet werden können. Sie werden vermutlich durch eine Plasmamembran assoziierte NAD(P)H-Oxidase gebildet (Suzuki et al. 1998).

1.6 Regulation der Apoptose

1.6.1 IAPs-Inhibitorproteine der Caspasen

1.6.1.1 Struktur und Funktion der IAPs

Die Inhibitoren der Apoptose (IAPs) wurden ursprünglich in Baculoviren identifiziert, wo sie einen viralen Mechanismus verstärken, indem sie die Apoptose durch die Wirtszellen verhindern (Birnbaum et al. 1994).

Zelluläre IAPs wurden darauf folgend in Insekten und Vertebraten entdeckt (Rothe et al. 1995; Duckett et al. 1996; Liston et al. 1996b; You et al. 1997). Alle IAPs beinhalten eine Baculovirus IAP repeat Domäne (BIR), die notwendig ist für die antiapoptotische Funktion der IAPs. XIAP, c-IAP-1 und c-IAP2 binden direkt an Caspase-3, -7 und -9, inhibieren diese - jedoch nicht die Caspasen-1, -6, -8 und -10 oder *ced-3* (Deveraux et al. 1997; Roy et al. 1997). Die Struktur der Gene für cIAP-1, cIAP-2 sind sehr ähnlich zu XIAP. Beide Proteine haben drei BIR Domänen, eine CARD-Domäne und am c-terminalen Ende eine RING-Domäne (really interesting new gene), die eine E3 Ubiquitin-Ligaseaktivität besitzt. Smac/DIABLO, ein mitochondriales Protein, das während der Apoptose in den Intermembranraum freigesetzt wird, ist in der Lage, den inhibitorischen Effekt von IAPs aufzuheben, da Smac/DIABLO an XIAP bindet, die Caspasen verdrängt und deren Aktivierung ermöglicht. Notwendig für Bindung von Smac/DIABLO an XIAP ist ein konserviertes Tetrapeptidmotiv das auch in HtrA2/Omi vorhanden ist, ein weiterer proapoptotischer Faktor (van Loo et al. 2002). Man geht davon aus, daß die Inhibierung der Caspasen evolutiv konserviert ist und eine wichtige Rolle in der Entstehung von Krankheiten spielen. Das NAIP-Protein (neural apoptosis inhibiting protein) war eines der ersten, daß identifiziert wurde, und in Patienten mit SMA (Spinal muscular atrophy) deletiert ist (Liston et al. 1996a). Der primäre Defekt von SMA konnte auf das SMN-Gen (Survival motor neuron gene) zurückgeführt werden und es wurde gezeigt, daß eine Deletion sowohl im SMN- als auch im NAIP-Gen dafür verantwortlich ist. Das SMN-Protein bindet dabei an Bcl-2 und verhindert somit die Apoptose (Iwahashi et al. 1997), was zu der Vermutung führt, daß NAIP für das Überleben von bestimmten Typen von Neuronen notwendig ist (Xu et al. 1997). XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 kommt eine große Bedeutung bei humanen Gliomatumoren zu.

Überexpression der IAPs führt dazu, daß die Gliomazellen gegen einige apoptotische Stimuli resistent sind (Wagenknecht et al. 2001).

1.6.2 Die Bcl-2 Familie

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie gelten als Schlüsselregulatoren in der Kontrolle der Freisetzung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren (Kaufmann et al. 2001). In Säugetieren sind bis heute 30 verwandte Gene identifiziert worden. Die Bcl-2 Genfamilie enthält sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Mitglieder (siehe. Abb. 1.6). Zu den antiapoptotischen Proteinen gehören Bcl-w, Bcl-X_L, A1 und Mcl-1, von denen alle die Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4 beinhalten, eine Interaktionsdomäne die für die Apoptoseinduktion von Nöten ist (Cory et al. 2002; Mund et al. 2003). Die proapoptotische Gruppe kann wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden. Die Bax-Familie besteht aus Bax, Bok und Bak und besitzen die Domänen BH1, BH2 und BH3, wobei die BH3-only Proteine (Bid, Bik, Bmf, Hrk, Noxa, PUMA, Blk, BNIP3 und Spike) ein verkürztes BH3-Motiv aufweisen. Die genaue Funktion von Bcl-2 Genen ist noch nicht völlig geklärt, aber man kann davon ausgehen, daß sie sowohl die Membranintegrität steuern, als auch an der Freisetzung von mitochondrialen Proteinen ins Zytoplasma beteiligt sind (Cory et al. 2002).

Wie können jedoch Bcl-2 Proteine die Membranintegrität beeinflussen? Eine sehr wichtige Rolle spielen dabei Bax und Bak.

Bax und Bak sind beide wahrscheinlich an der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran beteiligt, bilden Kanäle oder interagieren mit Komponenten der *Permeability Transition Pore* (PT)-Pore wie zum Beispiel VDAC (voltage deependent anion channel) (Tsujimoto et al. 2000). Wird Bax inaktiviert, wird Apoptose, aber nur sehr schwach, ausgelöst, wohingegen bei Inaktivierung von Bak keine Apoptose auftritt. In Doppelknockout-Mäusen konnte gezeigt werden, daß es während der Embryonalentwicklung zu großen Störungen kommt. Zellen die man aus diesem Knockoutexperiment gewonnen hat (Bax^{-/-}, Bak^{-/-}), sind insensitiv gegen Behandlung mit Etoposid oder auf UV-Bestrahlung (Lindsten et al. 2000; Wei et al. 2001). Im Gegensatz dazu, führen die antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder zur Inhibition von Apoptose, indem sie an die BH3-Domäne von antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern binden, die Bax- oder Bak-Aktivierung bzw. Oligomerisierung verhindern, und dadurch mitochondriale proapoptotische Ereignisse hemmen. Überexpression

von Bcl-2 oder Bcl-X_L zum Beispiel sind auch direkt an der Ausbildung von ROI beteiligt, verhindern den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials und damit auch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie zum Beispiel Cytochrom c (Reed et al. 1998). Verschiedene Arbeiten zeigten, daß Bcl-2 und Bcl-X_L durch die Verschiebung des Redox-Potenzials die Zellen vor Apoptose schützen (Ellerby et al. 1996; Bojes et al. 1997; Mirkovic et al. 1997).

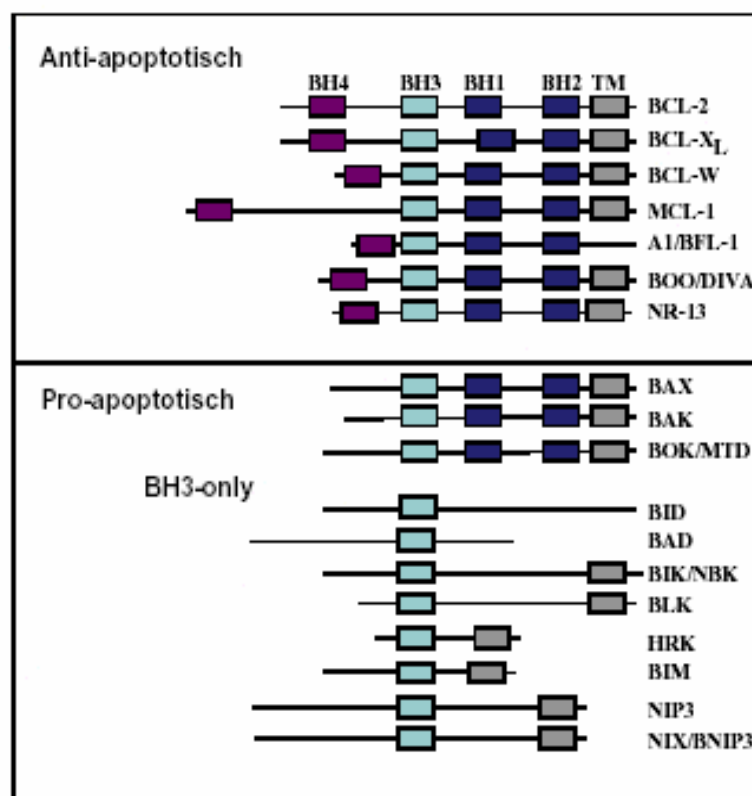


Abb. 1.5

Mitglieder der Bcl-2 Familie. Die Bcl-2-Genfamilie enthalten bis zu vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH 1-4), einige verfügen über eine hydrophobe Transmembrandomäne (TM). Die Bcl-2-Familie besteht aus pro und antiapoptotischen Mitgliedern wobei die proapoptotischen nochmal in Multi-BH-Domänen-Proteine und in BH3-only Proteine unterteilt werden können (Gross et al. 1999).

1.7 Apoptose am endoplasmatischen Reticulum (ER)

Das endoplasmatische Reticulum (ER) ist mit verschiedenen Mechanismen an der Apoptoseinduktion beteiligt: A) Unfolded Protein Response (UPR), B) Ca^{2+} -Signaling, C) Caspase-12 und D) Bap31.

1.7.1 Unfolded Protein Response (UPR)

Die Anhäufung von ungefalteten Proteinen kann durch Reagenzien wie Tunicamycin (blockiert die N-gekoppelte Proteinglykosylierung), Brefeldin (inhibiert den ER-Golgi-Transport) oder DTT (dadurch wird die Bildung von Disulfidbrücken inhibiert) gehemmt werden. Ungefaltete Proteine akkumulieren im Lumen des ER und binden an die ER Chaperone BiP/Grp78, wodurch es zur Auflösung der Bindung zwischen BiP/Grp78 und Ire- α kommt, eine Transmembran Serin/Threonin-Kinase, die während der Dissoziation von BiP/Grp78 oligomerisiert und sich über die zytosolische Kinasedomäne selbst phosphoryliert. Der N-Terminus von Ire1- β (homolog von Ire- α) besitzt eine Ribonukleaseaktivität und schneidet die 28S-rRNA und inhibiert dadurch die Proteintranslation (Iwahashi et al. 1997). ER-Stress aktiviert neben Ire1- α und - β auch ER-Transmembranproteine wie PERK (PKR-ähnliche endoplasmatische Retikulumkinase) und ATF-6 (Patil et al. 2001).

Ähnlich wie Ire1- α wird PERK oligomerisiert und autophosphoryliert, das dann PERK den Translations-Initiationsfaktor eIF2- α aktiviert, das wiederum zu einer geringeren Proteinsynthese führt. ER-Stress führt dazu, daß ATF-6, ein ER-Membranprotein geschnitten wird. Die zytosolische Domäne von ATF-6 wandert in den Kern, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert. ATF-6 führt dann weiters zur Aktivierung von Genen die ein ER-Stress-Element in der Promotorregion haben. Dazu gehören unter anderem Chaperone wie BiP/Grp78 und Calreticulin, CHOP/GADD153, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Bcl-2 herabsetzt und daher Apoptose induziert (McCullough et al. 2001).

1.7.2 Calciumaustritt

Calcium liegt im ER-Lumen entweder frei oder gebunden in Form von Calreticulin und Calnexin vor. Calcium wird vom Zytosol durch die Sarcoplasmatische/endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) aufgenommen, und wird durch den Inositol-1,4,5-triphosphat (InsP3)/Calciumkanal in das Zytoplasma entlassen. Das Übersteigen eines gewissen Calciumlevels im ER kann proapoptotisch wirken. Wird SERCA durch Thapsigargin gehemmt, wird Apoptose induziert. Bip/Grp78 verhindert Ionomycin- (aktiviert Calpain) induzierte Apoptose und fördert die Mobilisierung von Calcium im ER (Miyake et al. 2000). Im Gegensatz dazu, führt die Blockierung von BiP/Grp78 zur erhöhten Apoptoserate durch Calciumdepletion am ER (Jamora et al. 1996). Calreticulin, ein ER ständiges, calciumbindendes Protein kann den Calciumlevel steuern, indem es die Aktivität von SERCA und InsP3R steuert. Calreticulin ist aber auch ein glykoproteinbindendes Chaperon und führt durch Überexpression zur Apoptose (Johnson et al. 2001). ER-Stress führt des weiteren auch zur mitochondrialen Membranpermeabilisierung (MMP). Überexpression von Calreticulin sensibilisiert die Zellen gegenüber der Freisetzung von Cytochrom c sowie gegenüber Apoptose induziert durch Thapsigargin, Etoposid und Staurosporin. Obwohl die Bcl-2 verwandten Proteine hauptsächlich in den Mitochondrien wirken, können sie auch am ER ihre Wirkung entfalten. Bcl-2/Cb5, eine Bcl-2 Variante die ausschließlich im ER zu finden ist, verhindert Apoptose durch Tunicamycin und Brefeldin A (Hacki et al. 2000; Annis et al. 2001). Diese Variante von Bcl-2 verhindert die Freisetzung von Cytochrom c und den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials obwohl sie ausschließlich am ER zu finden ist. Wildtyp Bcl-2 Proteine führen jedoch zu einer Reduktion der Calciumkonzentration im ER und erhöhen wahrscheinlich die Membranpermeabilität vom ER für Calcium (Foyouzi-Youssefi et al. 2000).

Viele Proteine die am ER lokalisiert sind, können auch an genetischen Defekten beteiligt sein. Ein Beispiel dafür ist die Mutation von Presenilin-1, welches bei der Erkrankung Alzheimer eine Rolle spielt. Mutationen bei Presenilin-1 führt zur überhöhten Produktion des neurotoxischen Peptids Amyloid- β und führt zur erhöhten Freisetzung von Calcium aus dem Lumen des ER (Eckert et al. 2003).

1.7.3 Beteiligung von Caspase-12

Auch die Caspase-12, welche an der zytoplasmatischen Seite des ERs lokalisiert ist, spielt bei ER-Streß induzierter Apoptose eine wesentliche Rolle, und wird nicht durch TNF- α oder Fas-Ligand bei rezeptorvermittelten und mitochondrialen Apoptosesignalwegen aktiviert (Nakagawa et al. 2000). Dementsprechend sind Caspase-12 $-/-$ embryonische Mausfibroblasten teilweise resistent gegen Apoptoseinduktion durch Brefeldin A, Tunicamycin oder Thapsigargin (Breckenridge et al. 2003). Caspase-12 wird proteolytisch durch m-Calpain aktiviert, eine Ca^{2+} -zytosolische Cysteinprotease, welche Bcl-X_L schneidet und in ein proapoptotisches Fragment (Bcl-X_s) umwandelt (Nakagawa et al. 2000). Obwohl dies einen Mechanismus für ER-Streß durch Ca^{2+} -Freisetzung darstellt, um Caspase-12 zu aktivieren, ist die Beteiligung von m-Calpain streng limitiert, und die Prozessierung anderer Initiatorcaspasen reicht für die Aktivierung von Caspase-12 nicht aus (Boatright et al. 2003). Während der *Unfolded protein response* interagiert TRAF2 mit Procaspase-12 und verstärkt die Aktivierung durch ER-Stress. Bis zum heutigen Tage ist noch unklar, ob eine humane Form der Caspase-12 existiert, oder ob die Aufgabe von Maus-Caspase-12 beim Menschen durch andere Caspasen (Caspase-4 oder -5) übernommen wird. Unklar ist auch noch wie Caspase-12 aktiviert wird, obwohl die Aktivierung von Bax/Bak am ER wahrscheinlich notwendig ist (Zong et al. 2001).

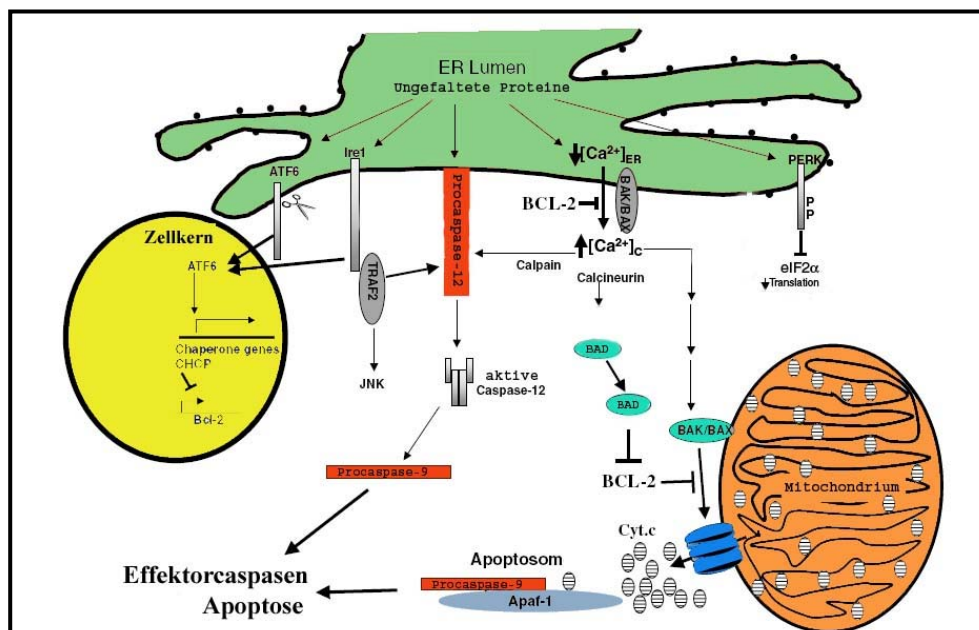


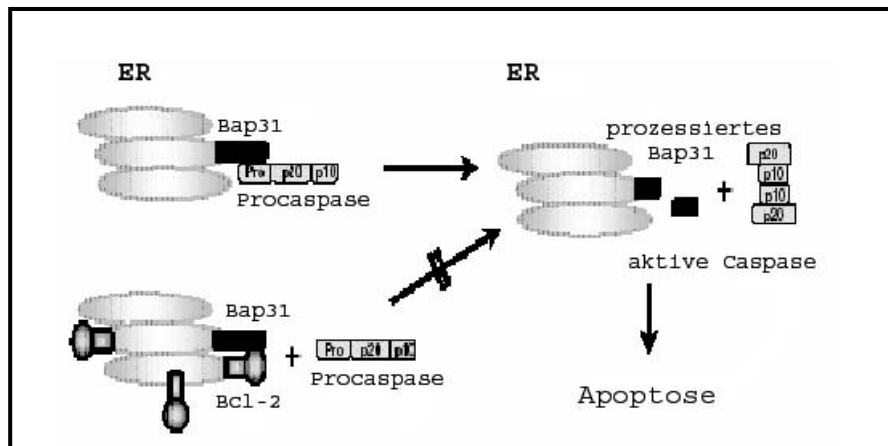
Abb. 1.6
Überblick über Apoptose am ER. Erklärung im Text.

1.7.4 Das Protein Bap31 reguliert Apoptose am endoplasmatischen Retikulum

Bap31 ist ein 28 kDa großes integrales Membranprotein das in jeder Zelle exprimiert wird, und am ER, wo es sowohl ein Oligomer als auch ein Heterodimer mit Bap29, einem weiteren ER-Protein, bildet, vorkommt.

Bap31 ist ein wichtiger Apoptoseregulator am ER und gleichzeitig auch ein Caspase-8-Substrat, es enthält zwei identische Caspaseschnittstellen im C-terminalen zytoplasmatischen Teil. Ein nach Prozessierung durch Caspase-8 entstehendes 20 kDa Fragment besitzt Apoptose-induzierende Eigenschaften, ein Mechanismus, der an Bcl-2 erinnert, dessen prozessierte Fragmente proapoptotisch sind und zu einer Amplifikation des Apoptosesignals beitragen (Ng et al. 1998; Nguyen et al. 2000; Breckenridge et al. 2003).

Es konnte gezeigt werden, daß Bap31 nach Apoptosestimulation eine ER-spezifische Isoform von Caspase-8 bindet: Procaspase-8L, welche bezüglich Caspase-8 eine 59 Aminosäurereste umfassende N-terminale Domäne enthält, die eine Interaktion mit Bap31 ermöglicht (Breckenridge et al. 2003). Apoptoseinduktion durch das Onkogen E1A induziert die Assoziation von Procaspase-8L mit Bap31. Procaspase-8L wird durch einen Mechanismus prozessiert, der durch Bcl-2 inhibierbar und abhängig von Bap31 ist. So können Zellen, die defizient an Bap31 und dessen Homolog Bap29 sind, Procaspase-8L nach Apoptoseinduktion durch E1A nicht prozessieren. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Der zytosolische Teil des humanen Bap31 beinhaltet eine Death-Effektordomäne und eine überlappende coiled-coil Domäne (DECC), die von identischen Caspase-8 Erkennungssequenzen flankiert ist und am C-Terminus mit einem ER-Einlagerungssignal (KKXXX) ausgestattet ist (Ng et al. 1997).

**Abb. 1.7**

Wirkungsweise von Bcl-2 auf Bap31. Bcl-2 kann mit Bap31 interagieren und verhindert dadurch direkt die Interaktion zwischen Bap31 und einer Procaspase. In Abwesenheit von Bcl-2, führt die Interaktion zwischen Bap31 und der Procaspase zur Prozessierung beider Proteine. Dabei wird ein apoptotisches Bap31-Fragment und eine aktive Caspase gebildet.

Neben Bap31 sind noch weitere Proteine in den letzten Jahren entdeckt worden, die am ER eine entscheidende Rolle in der Apoptose spielen. So wurde im Jahre 2002 mit Scotin ein proapoptotisches Gen gefunden. Endogenes Scotin ist im ER von primären und Tumorzellen lokalisiert. Nach Transfektion kann es im ER und in der Kernhülle nachgewiesen werden, jedoch nicht im Golgi-Apparat und in den Mitochondrien. Dieses Gen wird in vivo durch UV-Bestrahlung induziert. p53 bindet spezifisch an die p53 Bindungsstelle, die im Promotor vom Scotin-Gen enthalten ist, und transaktiviert direkt das Gen. Die prolin-reiche Region des Gens dürfte für dessen Lokalisation im ER verantwortlich sein (Bourdon et al. 2002).

ARMER (Apoptotic regulator in the endoplasmatic reticulum) ist ein weiteres Beispiel für ein antiapoptotisch wirkendes Gen. ARMER ist ein ER ständiges integrales Membranprotein mit 4 Transmembrandomänen und einer COOH-Terminalen KKXXE (ER-Einlagerungssignal) Sequenz. Zelllinien, in denen ARMER überexprimiert ist, sind gegen Serumentzug, Doxorubicin, UV Bestrahlung, TNF- α und ER-Stress induzierenden Reagenzien wie Brefeldin A, Tunicamycin und Thapsigargin resistent.

Analysen der Apoptosesignalkaskade haben gezeigt, daß wenn ARMER überexprimiert ist, die Proteolyse des Caspase-9 spezifischen Substrates LEDH-AFC, sowie endogene Substrate von Caspase-9 bei Stimulierung mit oben genannten Reagenzien inhibiert werden (Lui et al. 2003).

Mit Spike (Small protein with inherent killing effect) wurde ein neues BH3-only Protein identifiziert, das auch am ER lokalisiert ist und mit Bap31 interagiert, wobei Spike in der

Lage ist, die Bindung zwischen Bap31 und Bcl-X_L zu inhibieren. Durch die zusätzliche Runterregulierung von Spike in gewissen Tumoren wird auch eine Beteiligung in der Tumorgenese vermutet (Mund et al. 2003).

Obwohl noch sehr wenig über den Zusammenhang zwischen Apoptose und ER bekannt ist, unterstreichen diese Daten die Notwendigkeit von ER lokalisierten Proteinen.

2

AUFGABENSTELLUNG

Da erst ein Teil der Proteine bekannt sein dürfte, die unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen an der Apoptoseinduktion beteiligt sind, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue Komponenten von Apoptosewegen zu identifizieren und zu beschreiben.

Hauptaugenmerk wurde dabei auf zwei der wichtigsten an der Apoptose beteiligten Organellen gelegt. Das sind zum einem die Mitochondrien, und zum anderen das endoplasmatische Retikulum (ER). Insbesondere über Apoptose und die am ER befindlichen Proteine ist bislang noch wenig bekannt.

Für die Identifizierung von apoptotischen Genen wurde ein von Grimm und Leder (1997) entwickelter genetischer Expressionsscreen angewendet, der die rasche Untersuchung ganzer cDNA-Bibliotheken erlaubt. Er beruht auf der transienten Transfektion von Einzelplasmiden von einer normalisierten Maus-cDNA-Bibliothek in humane Nierenzellen (293T) mit anschließender phänotypischer Analyse apoptotischer Veränderungen.

Von den aus diesem Screen erhaltenen Klonen, die bei Überexpression proapoptotisch wirkten, wurden zwei cDNAs ausgewählt, die schnell und effizient Zelltod auslösten:

- 1) CybL, ein Bestandteil von Komplex II der Atmungskette, konnte erstmals als apoptoseinduzierend beschrieben werden und beschreibt dessen Rolle in der Atmungskette.
- 2) Bei Saip (**S**mall **a**poptosis **i**nducing **p**rotein) handelt es sich um ein völlig neues, bisher unbeschriebenes Protein das am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, und mit anderen Proteinen, die sich ebenfalls am ER befinden, interagiert.

3 MATERIALIEN

3.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid-Lösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biomol, Hamburg
Ammoniumperoxiddisulfat	Sigma, München
Bacto Agar	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	BioTech, St. Leon-Rot
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Ethylendioxy-bis-(ethylenitril)-tetraacetat (EGTA)	Biomol, Hamburg
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-	Biomol, Hamburg

ethansulfonsäure)

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Milupa, Friedrichsdorf
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Eggenstein
Nonidet P-40	Sigma, München
Phenol	Sigma, München
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, München
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, München
Saccharose (Sucrose)	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Sigma, München
TEMED	Sigma, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, München
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Sigma, München
Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Sigma, München
Natriumazid	Sigma, München

Uridin	Sigma, München
Wasserstoffperoxid (33%)	Sigma, München

3.2 Verbrauchsmaterial

3.2.1 Antibiotika und biochemische Reagenzien

Aktinomycin D	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Arsentrioxid	Sigma, München
ATP	Sigma, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, München
Cis-Platin	Sigma, München
Cycloheximid	Sigma, München
EGTA	Calbiochem, La Jolla, USA
Etoposid	Sigma, München
Interferon- γ (human, rekombinant)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
Menadion	Sigma, München
Paclitaxel (Taxol)	Sigma, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
Streptomycin	Sigma, München
Tetracyclin	Sigma, München
TTFA	Sigma, München
Tumor-Nekrose-Faktor α (human, rekombinant)	Biomol, Hamburg
Z-VAD-fmk (Z-Val-Ala-Asp (oMe)- Fluormethylketon)	Enzyme Systems Products, Livermore, USA

3.8.1 Verbrauchsmaterial

Einmalkunststoffwaren	Firmen B. Braun (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Josef Peske (Aindling-Pichl), Sarstedt (Nümbrecht), und Zinsser Analytic (Frankfurt)
Kulturgefäße	Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Nunc (Wiesbaden)
Einmalhandschuhe	Semperit (Wien)
Sterilfilter	Firmen Millipore (Eschborn), Pall (Dreieich) und Renner (Dannstadt)
Transfermembran (PDVF-Membran)	Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Röntgenfilme	Firma Kodak (Stuttgart)

3.3 Reaktionssets

BioRad Protein Microassay	BioRad, München
Caspase-3 Aktivitätsassay	Roche, Mannheim
Long Template PCR Kit	Roche, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, USA
Oligofectamine Transfektionsreagenz	QIAGEN, Hilden
Complete without EDTA, Proteaseinhibitor -Mischung	Roche, Mannheim
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
BioRad <i>Protein Microassay</i>	BioRad, München
Effectene Transfektionsreagenz	QIAGEN, Hilden
Fugene6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
QIAGEN Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi)	QIAGEN, Hilden
QIAex II DNA-Extraktion aus Agarosegelen	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit (RNA-Isolation)	QIAGEN, Hilden

3.3.1 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen gewählt.

3.3.2 Längen- und Molekulargewichtsstandards

Full-range rainbow recombinant protein molecular weight marker	Amersham Pharmacia (Freiburg)
100 bp SmartLadder SF, DNA Größenstandard	Eurogentec, Seraing (Belgien)
1 kb SmartLadder, DNA Größenstandard	Eurogentec, Seraing (Belgien)

3.4 Oligonukleotide

Name	Herkunft	Sequenz (5'→ 3')
SAIP-ORF	Maus cDNA (aus <i>screen</i>)	Forward: CCGGAATTCGCGGCCATGGAGGCCGTGCTGA Reverse: CCTTTTGC GGCCGCTCAGGATTTGGACTTGGAG
SAIP-ORF	Human cDNA	Forward: CGCGGATCCCCACCATGGAGGCCGTGCTG Reverse: CGCTCTAGATCAGGATTTGGACTTGG
SAIP-GST	Maus cDNA	Forward: CCGGAATTCGCGGCCGAGGCCGTGCTGAACG Reverse: CCTTTTGC GGCCGCTCAGGATTTGGACTTGGAG
Spike-(HA,myc)	Maus cDNA (Th. Mund)	Forward: CCAAGCTTGGGGCCAAGATGAACCGATTCTTC Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCGAAGCGGGAATCTGCGGCAG
ΔN-19 (HA,myc)	Maus cDNA (Th. Mund)	Forward: CCAAGCTTGGGGGCGACATGTGCATTGGGACGGTGGATAGC Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCGAAGCGGGAATCTGCGGCAG
CII-3	Maus cDNA	Forward: CCGGAATTCCAACCGATGGCTG Reverse: ATTATAATGCGGCCGCTCACAGGGCGGCCAG
CII-3- Δ1TM	Maus cDNA	Reverse: ATTATATGCGGCCGCCACAAACATCAAATACGAC

CII-3- Δ2TM	Maus cDNA	Reverse: ATTATAATGCGGCCGCCACAAACATCAAATACGAC
CII-3 – Δ3TM	Maus cDNA	Reverse: ATTATAATGCGGCCGCCTGAGTGGTACATGAGCG
CII-3 – Δ4TM	Maus cDNA	Reverse: ATTATAATGCGGCCGCGGGGTATTGCCAGGCC
Eisenschwefelprotein (FeS)	Human	Forward: CTATGAATTCCCACCATGGCGGCGGTGGTCG Reverse: ATTATAATGCGGCCGCCAACTGAAGCTTTCTTCTC
Flavinprotein (FAD)	Human cDNA	Forward: CTATGAATTCCCACCATGTCTGGGGGTCCGG Reverse: ATTATAATGCGGCCGCCGTAGGAGCGAATGGCTG
Bcl2 (HA,myc)	Plasmid (St.Grimm)	Forward: CGGAATTTCGGAATATGGCGCACGCTGGGAGAACA Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCCTTGTGGCCAGATAGGCACC
Bcl-XL (HA,myc)	Plasmid (St.Grimm)	Forward: CGGAATTTCGGAATATGTCTCAGAGCAACCGGGAG Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCTTTCCGACTGAAGAGTGAGCC
Bap31 (HA, myc)	HeLa-cDNA (Th. Mund)	Forward: CGGAATTCAACAGGATGAGTCTGCAGTGG Reverse: TAGTGCATGCGGCCGCCCTCTTCTTCTTGTCCATG
pSHAG-Saip	Maus (C.Bernt)	Forward GATCCCCAAGAGCACGCAGTTTGAGTTTCAAGAGAACTCAAAC TGCGTGCTCTTTTTTTGGAAA Reverse: AGCTTTTCCAAAAAAGAGCACGCAGTTTGAGTTCTCTTGAAAC TCAAAC TGCGTGCTCTTGGG
CycD	Maus cDNA (T.Albayrak)	Forward: CCGCTCGAGATGCTGGCGCTGCGCTG Reverse: CCGGGATTC CTAACATCCCTAGCAGCC
pSHAG-Caspase2	Human	Forward: GATCTCCACAGCTGTTGTTGAGCGAATTCAAGAGATTGCTC AACAACAGCTGTTTTTTGGAAA Reverse: AGCTTTTCCAAAAAACAGCTGTTGTTGAGCGAATCTCTT GAATTCGCTCAACAACAGCTGTGGA

3.5 Puffer und Lösungen

Blocklösung A	5% (w/v) Milchpulver in TBS/T
Blocklösung B	2% (w/v) BSA in PBS
Complete ohne EDTA, 50x	1 Tablette „complete ohne EDTA“-Proteaseinhibitor-Mischung (Roche) in 25 ml ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% (w/v) SERVA Blue R (SERVA)
DNA-Auftragspuffer, 6x	10 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS (w/v), 30% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0
IP-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v), Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM MgCl ₂
Lysepuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v), Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM MgCl ₂
P1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
P2	200 mM NaOH, 1% SDS
P3	3 M K-Azetat, pH 5,5
Paraformaldehyd-Lösung	37% (w/v) Paraformaldehyd dunkel bei 4°C gelagert, Arbeitslösung: 3,7% in PBS
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 eingestellt mit NaOH
PBS-T	0,05% Tween-20 in PBS
Hypotoner-Lysepuffer	20 µg/ml Propidium iodid, 0,1% (w/v) Na ₃ Citrat, 0,1% Triton X-100 in PBS
Ponceau-Färbelösung	0,1% Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer, 10x	209 mM Tris/HCl, 41% (w/v) Glycerin, 7,7% (w/v) SDS, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 6,8

SDS-Probenpuffer, 2x	125 mM Tris/HCl, 17% (w/v) Glycerin, 4,1% SDS, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 2% (v/v) β -Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Sammelgelpuffer, 4x	0,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer, 4x	1,5 M Tris/HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
SSC, 20 x	0,3 M Trinatriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0 eingestellt mit HCl
TAE-Puffer, 5x	450 mM Tris, 450 mM Borsäure, 10 mM EDTA
TBS	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBS/T-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,05% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Triton-X-100-Lösung	0,2% (w/v) Triton-X-100 in PBS
Transferpuffer	47,9 mM Tris, 38,6 mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
TSS	10% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM $MgCl_2$ in LB-Medium
Vorhybridisierungslösung	1 M NaCl, 10% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Heringssperma-DNA

3.6 Plasmide

pcDNA3	3,5 kbp großes Plasmid, mit CMV-Promoter zur Expression rekombinanter DNA in eukaryontischen Zellen; enthält eine Neomycin-Resistenzkassette (Invitrogen, Heidelberg) pcDNA3HA Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen HA-Tag
pcDNA3myc	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen myc-Tag
pcDNA3-YFP	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen C-terminalen YFP-Tag (Alexis Schubert, Clontech)
pcDNA3Δ	Derivat von pcDNA3 mit deletierter Neomycin-Resistenzkassette (Grimm et al. 1998)
pGEX4-T1	Prokaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für einen N-terminalen GST-Tag (Amersham-Pharmacia)
GFP-pLantern	Eukaryontischer Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für GFP (GibcoBRL)
Bcl2-HA	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bcl-2 (Thomas Mund, Doktorarbeit)
Bap31-HA/myc	Eukaryontischer pcDNA3-Expressionsvektor, trägt die kodierenden Sequenzen für humanes Bap31 (Thomas Mund, Doktorarbeit) pBluescript II KS (-) Stratagene
pβ-Gal	cDNA von β-Galactosidase unter Kontrolle des LTR des Maloney-Maus-Leukämie-Virus' (erhalten von P. Leder, Harvard-University, USA)
pLucCMV	cDNA von Leuchtkäfer-Luciferase unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pRcCMV (Invitrogen, Heidelberg)

pNedd2 cDNA von Caspase-2 (erhalten von S. Kumar, Adelaide, Australien) unter Kontrolle des CMV-Promotors; basiert auf pRcCMV (5,5kb, Invitrogen, Heidelberg)

3.7 Zelllinien und Bakterienstämme

3.7.1 Eukaryontische Zelllinien

293T	Human Embryonic Kidney
B9/B30	Chinese Hamster Lung Fibroblasts
BHK	Baby Hamster Kidney
CHO	Chinese Hamster Ovary
HeLa	Cervix Carcinoma
HeLa p0	Cervix Carcinoma, ohne mitochondriale DNA
Jurkat	Human T cell Leukemia
L929	Maus Fibroblasten
MCF7	Human Breast Adenocarcinoma
MDA-MB435S	Human Breast Adenocarcinoma (ATCC)
NIH3T3	Maus Fibroblasten
NRK	Normal Rat Kidney
PC3	Prostate Carcinoma
Raji	Burkitt's Lymphoma
Rat1	Rat Fibroblasts

Die Zelllinien wurden in DMEM (Sigma) mit den Zusätzen L-Glutamin, Natriumpyruvat und Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) kultiviert, entweder mit 5% (293T) oder 10% (alle anderen Zelllinien) fötalem Kälberserum (Sigma-Aldrich) versetzt.

3.7.2 Bakterienstämme

DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
SURE	BF ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (rB-mB-) <i>gal</i>

3.8 Zellkulturmedien

3.8.1 Medien für die Zellkultur

Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM)	Sigma, München
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma, München
L-Glutamin (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10 x)	Life Technologies, Karlsruhe

3.8.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl
Superbroth-Medium	3,5% (w/v) Bactotrypton, 2% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl
SOC-Medium	2% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

3.9 Antikörper

Name	Antigen	Herkunft	Referenz/Hersteller
Anti-Bax	Humanes Bax	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Anti-Bcl2	Humanes Bcl2	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
Anti-Cytochrome c	Humanes-Cytochrome c	Maus, monoklonal	PharminGen Europe
Anti-Tim23	Human Tim23	Maus, monoklonal	Transfection Laboratories
Anti-Fas (CH-11)	Human Fas	Maus, monoklonal	Kamiya Biomedical, USA
Anti-mouse IgG Peroxidase-conjugate		Ziege, polyklonal	Amersham Pharmacia, Freiburg
Anti-rabbit IgG Peroxidase-conjugate		Ziege, polyklonal	Amersham Pharmacia, Freiburg
Anti-rat IgG Peroxidase-conjugate		Esel, Ziege polyklonal	Roche, Mannheim
Anti-myc IgG Peroxidase-conjugate		Maus, monoklonal	Roche, Mannheim
Anti-mouse IgG Rhodamine-		Ziege, polyklonal	Roche, Mannheim

conjugate			
Anti-rabbit IgG AlexaGreen- conjugate		Ziege, polyklonal	Amersham Pharmacia, Freiburg

3.10 Verwendete Geräte

Geräte

Durchfluscytometer: FACS-Calibur

E.coli-Pulser (Elektroporationsgerät)

Brutschränke & Inkubatoren,

Inkubationsschüttler: Elektrophoresekammern

Power-Supply für die Gelelektrophorese

Electrophoresis Power Supply EPS 600

Mikroskope: Axiovert 25

Fluoreszenzmikroskop: Axiophot IM-35

Kühlzentrifugen: 5417 R, 4K15, RC 5B Plus

Pipetten

Tischzentrifugen

UV-Tisch: UVT-14L, Eagle Eye

Vakuumzentrifuge: Concentrator 5301

Spektrophotometer: DU 530

PCR: Mastercycler Gradient,

Mastercycler Personal

Ultraschallgerät: Cell Disruptor B15

Glasdouncer: Glas Col 009CS38

Inkubatoren:

Forma Scientific 3121 (21% O₂ bzw. 1% O₂)

Hersteller

Becton Dickinson, Heidelberg

BioRad, München

Heraeus, Hanau

(Eigenbau) MPI-Werkstatt

Pharmacia Biotech

Zeiss, Oberkochen

Zeiss, Oberkochen

Eppendorf, Sigma, Sorval

Eppendorf

Gilson, Middleton, USA

Eppendorf

Herloolab, Stratagene

Eppendorf

Beckman

Eppendorf

Eppendorf

Branson

Cole-Parmer Instrument Co

Forma Scientific, Marietta, USA

4 METHODEN

4.1 Prokaryontische Zellkultur

Die rekombinanten Bakterien wurden in einem 37°C temperierten Brutschrank mit Schüttleinrichtung durchgeführt. Die Bakterien wurden dazu in LB-Medium oder auf LB-Agar Platten mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Kanamycin über Nacht kultiviert.

Für die Experimente wurden die Bakterienstämme *E. coli Sure* (Stratagene, La Jolla, USA) und *E. coli DH5α* (Hanahan 1983) verwendet.

LB-Medium:

1% Bacto-Trypton
0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl

LB-Agar:

1% Bacto-Trypton
0,5% Hefeextrakt
1,5% Agar

4.1.1 Lagerung der Bakterien

Von einer über Nacht Bakterienkultur wurden 0,85 ml mit 0,15 ml einer sterilen Glycerinlösung (87%) in ein Eppendorf-Cup pipettiert und bei -80°C gelagert.

4.2 Herstellung kompetenter Bakterien

4.2.1 Herstellung elektrokompeter Bakterien

Als Vorlage wurde die Vorschrift von Stratagene verwendet. Zudem wurden 100 ml einer Über-Nacht-Kultur mit 900 ml LB-Medium versetzt und bei 37°C und 300 rpm solange wachsen gelassen, bis die OD_{600nm} zwischen 0,5 und 0,7 lag. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 5000 rpm 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde in einem Liter eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und anschließend

erneut 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 500 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert und nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Hierauf wurde das Pellet in 4 ml eiskaltem Glycerin (10%) aufgenommen, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Bakterien bei –80°C aufbewahrt.

4.2.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Um transformierbare Bakterien zu gewinnen, wurden 500 µl einer stationären Kultur von *E. coli DH5α*, *SURE* oder *BL21(DE3)* mit 50 ml LB-Medium verdünnt und in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Bakterien wurden dann bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 20 ml 0,1 M eiskalter CaCl₂ Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterienpellets in 4 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, mit 830 µl 87% Glycerin versetzt und in Aliquots à 50 µl in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

4.2.3 Transformation von Bakterienzellen

4.2.3.1 Elektrotransformation

Elektrokompetente Zellen (50 µl Aliquot) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,01 - 1,0 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Bakterien-DNA-Gemisch in Elektroporationsküvetten gegeben und in der Elektroporationskammer (Bio Rad) einer Stromspannung von 1,8 kV ausgesetzt (BioRad, München). Anschließend wurden die Bakterien mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien leicht „anzentrifugiert“. 2/3 des Überstandes wurden abpipettiert - und das Pellet noch mal resuspendiert, auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

4.2.3.2 Chemotransformation

Chemokompetente Zellen der Stämme *E.coli Sure* (50 µl Aliquots) wurden auf Eis aufgetaut. Hierauf wurden zur Bakteriensuspension 100 ng – 1 µg des zu transformierenden Plasmids pipettiert. Anschließend folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem 1,5 minütigen Hitzeschock bei 42°C. Die Bakteriensuspension wurde sofort 1 min auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium zugesetzt. Die so erhaltene Suspension wurde 30 min bei 37°C inkubiert, damit die Bakterien „anwachsen“ können. Anschließend wurden die Bakterien kurz anzentrifugiert und das SOC-Medium bis auf ca. 100 µl dekantiert. Die Bakterien wurden in dem restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf ampicillinhaltigen (25 µg/ml) LB-Agarplatten (in Einzelfällen auch Kanamycin) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C Brutschrank inkubiert.

SOC-Medium:

20 g Bacto Trypton
5 g Hefe-Extrakt
0,5 g NaCl
ad 1 l H₂O, autoklavieren
im Anschluß sterile Zugabe:
10 ml 1M MgCl₂
10 ml 1M MgSO₄
20 ml 20% (w/v) Glucose

4.3 Methoden der eukaryontischen Zellkultur

4.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle Arbeiten wurden unter der Sterilwerkbank (Heraeus, Hanau) mit sterilen Lösungen, autoklavierten Glaswaren und sterilem Kunststoffmaterial (Greiner, Solingen; Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) gehalten. Das Medium wurde mit 5% (293T-Zellen) oder 10% fötalem Kälberserum (FKS, alle anderen Zelllinien), 2 mM Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat sowie 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin supplementiert. Die B9- und B30-Zellen wurden zusätzlich mit 2 mM nicht essentiellen Aminosäuren (MEM non Essential Amino Acids, Gibco BRL) versetzt.

Wenn die Zelldichte eine Konfluenz von ca. 70-80% erreichte, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation in 5 ml 0,25% Trypsin für ca. 5 min bei 37°C abgelöst. Hierauf wurden die Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen mit 5 ml DMEM überführt (Gesamtvolumen 10 ml) und 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischen DMEM (mit allen Zusätzen) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in das gewünschte Plattenformat überführt. Die Zellen wurden auf diese Art ca. alle 2-3 Tage gesplittet.

100x MEM non Essential Amino Acids:	Aminosäure	g/l
	L-Alanin	890
	L-Asparagin	1320
	L-Asparaginsäure	1330
	L-Glutaminsäure	1470
	Glycin	750
	L-Prolin	1150
	L-Serin	1050

4.3.2 Lagerung und Auftauen von Zelllinien

Für die längerfristige Lagerung der Zelllinien wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80% trypsinisiert und bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml DMEM mit 10% FKS resuspendiert und mit 1 ml 2x „Einfriermedium“ versetzt. Die Suspension wurde in 2 ml Cryo-Röhrchen (Eppendorf) überführt, vermischt und direkt auf –80°C abgekühlt. Für die dauerhafte Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen so schnell wie möglich im Wasserbad bei 37°C „angetaut“ und anschließend im noch halbgefrorenen Zustand in eine Zellkulturschale mit viel Medium zum Ausverdünnen des DMSO ausgesät. Tags darauf wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium versorgt.

2x Einfriermedium: DMEM (mit allen Zusätzen)
20% FCS
20% DMSO

4.3.3 Transfektion von Gewebekulturzellen

Im folgenden werden verschiedene Transfektionsmethoden beschrieben, die für die Zelllinien angewendet worden sind.

4.3.3.1 Calciumphosphatpräzipitation

Die bekannteste Transfektionstechnik zur Transfektion von Säugertierzellen ist die Calciumphosphattransfektion (Graham et al. 1973). Hierbei wird die DNA in einer Calciumchloridlösung vorgelegt und mit Phosphatpuffer gemischt. Die gebildeten DNA-Calciumphosphat-Copräzipitate werden in das Kulturmedium gegeben, adsorbieren auf der Zelloberfläche und werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen.

Mit dieser Methode wurden sowohl 293T-Zellen als auch MCF7-Zellen transfiziert - das etwas abgeänderte Protokoll wird später beschrieben (siehe Abschnitt 4.3.3.1.1). Die Zellen wurden in verschiedenen Formaten gesplittet, kultiviert und beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 70-80% transfiziert. Bei den 293T-Zellen wurde vor der Transfektion das Medium gewechselt und mit Chloroquin so versetzt, daß eine Endkonzentration von 10 µM erreicht wurde. Für das Präzipitat wurde jeweils DNA in Bdest vorgelegt, mit 2,5 M CaCl₂ versetzt und das gleiche Volumen 2x HBS pH 6,9-7,1 tropfenweise zugesetzt. Ca. 20 min nach dem Mischen der Komponenten wurde das gebildete Präzipitat auf die Zellen gegeben. Fünf Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium hinzupipettiert. Als Kontrolle wurde ein qualitatives Reportergen GFP (Green fluorescence protein) transfiziert, um die Transfektionseffizienz bestimmen zu können.

In der folgenden Tabelle sind die Mengenangaben für die jeweiligen Zellformate angegeben

Format	V (Medium)	µg DNA	add H ₂ O	V (2,5M CaCl ₂)	V(2x HBS)	V(PBS)
24-Well	1 ml	0,2-1 µg	45 µl	5 µl	50 µl	0,5 ml
12-Well	2 ml	0,5-2 µg	67,5 µl	7,5 µl	75 µl	1,0 ml
6-Well	3 ml	1-4 µg	90 µl	10 µl	100 µl	1,5 ml
10 cm	10 ml	5-10 µg	450 µl	50 µl	500 µl	5,0 ml

Tab. 4.1 Calciumphosphattransfektion

4.3.3.1.1 Calciumphosphattransfektion mit Glycerolschock

Mit dieser Methode wurden nur MCF7-Zellen transfiziert. Wie bei der oben genannten Transfektion wurde DNA, Calciumchlorid und 2x HBS miteinander vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Präzipitat auf die Zellen pipettiert und für 8 h bei 37°C inkubiert. Damit wurde erreicht, daß die Zellmembran kurz „durchlässig“ wird und das Präzipitat besser von der Zelle aufgenommen wird. Das Medium wurde abgesaugt, und die entsprechende Menge 15% Glycerin in DMEM (ohne Zusätze) auf die Zellen pipettiert und für 3 min inkubiert. Hierauf wurde die Glycerinlösung abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium versorgt.

Format	V (Medium)	µg DNA	add H ₂ O	V (2,5M CaCl ₂)	V(2x HBS)	V(Glycerol)
12-Well	1,5 ml	3 µg	45 µl	5 µl	50 µl	0,75 ml
6-Well	2 ml	4 µg	67,5µl	7,5 µl	75 µl	1,5 ml

Tab. 4.2 Calciumphosphattransfektion mit Glycerolschock

4.3.3.2 Effectene Transfektion

Adhärente HeLa-Zellen wurden mit dem “Effectene Transfection Kit“ der Firma QIAGEN transfiziert. Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in die entsprechenden Plattenformate ausgesät. Die Mengen an DNA, EC-Puffer, Enhancer und Effectene und Medienmengen sind in Tabelle 4.3 angeführt.

Die zu transfizierende DNA wurde in EC-Puffer und Enhancer aufgenommen kurz gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe vom Effectene-Reagenz wurde wieder kurz gemischt und der Transfektionsansatz 20 min bei RT stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgesaugt, mit PBS gewaschen, und frisches DMEM hinzupipettiert. Nach der 20 minütigen Inkubation wurde noch die entsprechende Menge Medium komplett pipettiert und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte meistens über Nacht mindestens jedoch 6 h. Hierauf wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

Format	µg DNA	EC-Puffer	Enhancer	Effectene	Medium zum Mix	Medium in der Platte
6-Well	2,0 µg	100 µl	3,2 µl	1,6 µl	0,6 ml	4,0 ml
10 cm	10 µg	300 µl	16 µl	10 µl	3,0 ml	7,0 ml

Tab.4.3 Effectenetransfektion

4.3.3.3 Oligofectamin - Transfektion

Oligonukleotide wurden ausschließlich nach der Oligofectamine Methode in HeLa und HeLa S3-Zellen transfiziert. Dazu wurden die Zellen 30 min vor der Transfektion mit OPTIMEM (ohne Zusätze) gewaschen und OPTIMEM nachgelegt. Die Mengen der einzelnen Komponenten sind in der Tabelle 4.4 zusammengefaßt. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen wurde der Ansatz nach ca. 6 – 8 h mit 20% FCS - OPTIMEM aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Zellen 2x mit PBS gewaschen und neues Medium nachgelegt wurde.

Format	V (20µM Oligo)	V (OPTI-MEM)	V (Oligofect.)	V (OPTI-MEM auf Zellen)	V (Transf.)	V (20% FCS-OPTIMEM)
6-Well	10 µl	175 µl	15 µl	800 µl	1000 µl	1000 µl
10 cm	75 µl	825 µl	30 µl	4000 µl	5000 µl	5000 µl

Tab.4.4 Oligofectamintransfektion

4.4 DNA-Methoden

4.4.1 Plasmidminipräparationen

Je nach Bedarf wurden dazu die Mini, Midi und Maxi Kits von QIAGEN verwendet, und entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dabei werden die Bakterien durch alkalische Lyse lysiert. An die Anionen-Austauscher-Säule bindet selektiv doppelsträngige DNA und kann somit von RNA, Proteinen und anderen Zellkomponenten befreit werden. Zur schnellen Überprüfung der Bakterienkolonien wurde eine schnellere Methode angewendet. Dazu wurden 2 ml LB-Medium in einem 15 ml Falkon-Gefäß mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Tags darauf wurden die angewachsenen Bakterien 1 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl Puffer P2 5 min bei RT lysiert. Dabei werden die Proteine durch SDS, die chromosomale und auch die Plasmid-DNA durch die alkalischen Bedingungen denaturiert und die RNA im Verlauf der Reinigung durch RNase A degradiert. Im nächsten Schritt wurde die Suspension durch Zugabe von 150 µl eisgekühlten Puffer P3 neutralisiert und 5 min auf Eis inkubiert. Durch die hohe Salzkonzentration präzipitieren dabei denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS. Im Gegensatz dazu renaturiert bei diesem Schritt die Plasmid-DNA aufgrund ihrer zirkulären Struktur und bleibt in Lösung. In der folgenden Zentrifugation (5 min 14.000 rpm) wurden die Zellreste und präzipitierten Zellkomponenten pelletiert. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und durch Zugabe von 800 µl Ethanol gefällt. Direkt anschließend wurde erneut zentrifugiert (5 min 14.000 rpm). Das Pellet wurde mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min in einer Vakuumzentrifuge „getrocknet“. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 20 µl Millipore-Wasser aufgenommen.

Puffer P1: 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA

Puffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5 mit Eisessig

4.4.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen der DNA und hydrolysieren bestimmte Phosphodiesterbindungen innerhalb dieser Oligonukleotide. Dies ermöglicht eine gezielte Spaltung der DNA. Für den Restriktionsverdau wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer unter den entsprechend angegebenen Inkubationsbedingungen verwendet. Pro 1 µg DNA wurden 2 bis 5 U Restriktionsenzym eingesetzt.

4.4.3 Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

Um bei Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP-calf intestinal alkaline phosphatase).

Für die Dephosphorylierung wurde 1-20 pmol DNA in 100 µl Dephosphorylierungspuffer (Boehringer, Mannheim) mit 1 U alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert. Da die alkalische Phosphatase hitzestabil ist kann sie nicht hitzeinaktiviert werden. Um das Enzym zu entfernen, wurde mit je einem gleichen Volumen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (siehe Punkt 4.4.7.2). Für die Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor wurden 200 ng der linearisierten Vektor-DNA mit einem zwei- bis dreifachen molaren Überschuss des Fragments in einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet. Ligationpuffer und T4-DNA-Ligase wurden nach den Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt) zugegeben. Nach 60 min Inkubation bei RT oder Übernachtinkubation bei 16°C wurde die Ligase durch Erhitzen (5 min 65°C) inaktiviert. 5 µl der Ligungsreaktion wurde entweder durch Chemotransformation oder durch Elektroporation in Bakterien eingebracht (siehe Abschnitte 4.2.3.1 und 4.2.3.2).

4.4.4 Klonierung von RNAi-Konstrukten in pSUPER bzw. pSHAG-Vektorsystem

4.4.4.1 Klonierung in pSUPER Vektor

Der pSUPER-Vektor basiert auf dem pBluescript-KS-Plasmid von Stratagene. Die Oligos wurden nach folgendem Verfahren ausgesucht: Es wurde nach einer 19 nt langen Sequenz auf der mRNA mit möglichst zwei Adeninnukleotiden (AA) am 5' - und Thymidinnukleotiden (TT) am 3'-Ende gesucht. Diese Sequenz sollte zu keiner anderen Sequenz komplementär sein, 100 bp vom Beginn der mRNA entfernt liegen und einen GC-Gehalt von ca. 40-50% aufweisen. Des weiteren dürfen keine vier Adenine oder Thyminine in Folge enthalten sein. Die 19 nt lange Zielsequenz wird durch eine 9 nt Spacersequenz getrennt. Das resultierende Transkript bildet mit sich selbst eine 19 bp große Schleife. Dieses Transkript wird dann innerhalb der Zelle sehr schnell geschnitten und bildet dann das funktionelle siRNA Transkript, da die zuvor gebildete Schleife ein optimales Substrat für das Dicerenzym ist, das wiederum zwei Stränge mit zwei 3'-Uridinüberhängen bildet (Elbashir et al. 2001).

4.4.4.2 Hybridisierung („Annealing“) der Oligos

Die Oligos wurden in einer Konzentration von 3 mg/ml in Bidest gelöst. 1 µl des jeweiligen Oligos (5'-3' und 3'-5' Richtung) wurde in 48 µl *Annealing* Puffer aufgenommen und 4 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligos 10 min bei 70°C inkubiert und hierauf langsam auf 4°C abgekühlt.

Annealing Puffer: 100 mM KOAc
 30 mM HEPES-KOH pH 7.4
 2 mM MgOAc

4.4.4.3 Phosphorylierung der Oligos und Ligation in den pSUPER-Vektor siehe Abschnitt 4.4.3

4.4.5 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentration und Reinheit durch photometrische Messung

Die Ausbeute wurde durch photometrische Messung der isolierten Nukleinsäure bei OD_{260 nm} ermittelt. Eine Absorption von A_{260nm} = 1 entspricht 50 µg/µl. Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wurde zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge haben die aromatischen Aminosäuren der Proteine ihr Absorptionsmaximum; daher kann aus dem Quotienten OD_{260 nm}/OD_{280 nm} auf die Reinheit der DNA geschlossen werden. Der Quotient sollte im Idealfall bei 1,80 liegen.

Für diese Messung wurde die zu messende Probe 1:50 in Wasser verdünnt. Die genaue Länge der DNA wurde durch Gelelektrophorese bestimmt und wird in Abschnitt 4.4.7 beschrieben.

4.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasenkettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Für die PCR wurde die Platinumpolymerase von Gibco BRL in einem Reaktionsansatz von 50 µl verwendet.

Dabei wurde der folgende Reaktionsansatz gewählt:

<u>PCR-Ansatz:</u>	39,5 µl	Millipore-Wasser
	5 µl	10 x PCR-Puffer
	1 µl	25 mM MgCl ₂
	100 ng	DNA- <i>template</i> (Plasmid oder cDNA)
	1 µl	<i>Forward</i> -Oligonukleotid (10 µM)
	1 µl	<i>Reverse</i> -Oligonukleotid (10 µM)
	1 µl	dNTPs (25 mM je dNTP)
	0,75 µl	Polymerase (3,5 U/µl)

Beispielhaftes Standardprogramm:

Denaturierung	95°C, 30s
Primer-Annealing	60°C, 30s
Elongation	68°C, (1 min/kb)
Zyklen	26-35
Terminale Elongation	68°C, 5 min

4.4.7 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Für die Elektrophorese von Nucleinsäuren werden Agarosegele unter nativen Bedingungen verwendet. Agarose-Gelsysteme sind die Standardmethode für die Trennung, Identifizierung und Reinigung von Nucleinsäuren (Sambrook et al. 1989). Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Die Agarose wird durch Aufkochen in TAE gelöst und geliert beim Abkühlen. Zur Analyse wurde die in Wasser gelöste DNA mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt und im elektrischen Feld aufgetrennt. Als Referenz dienten definierte Größenmarker mit einer Reihe von definierten Banden (Eurogentec, Seraing, Belgien). Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einem Färbebad mit 10 µg/ml Ethidiumbromid in TAE gefärbt. Anschließend wurde das Gel in TAE entfärbt, mit Hilfe eines UV-Transilluminators visualisiert und mit einer Videokamera (Eagle-Eye II, Stratagene, La Jolla, USA) dokumentiert.

<i>6x Probenpuffer:</i>	40 mg	Xylencyanol
	40 mg	Bromphenolblau
	5 ml	Glycerin
	5 ml	Millipore-Wasser
	20 µl	0,5 M EDTA, pH 8,0

<i>50x TAE-Puffer:</i>	121 g	Tris-Base
	28,5 ml	Eisessig
	50 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	420 ml	Millipore-Wasser

4.4.7.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurden die entsprechenden, im langwelligem UV-Licht sichtbaren Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend *Qiaex II* oder *Qia Quick Spin* nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

4.4.7.2 Phenolextraktion

Die Phenolisierung ist die Standard-Extraktionsmethode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8) versetzt und gut durchmischt. Dadurch werden DNasen, RNasen, Ligasen und andere Proteine denaturiert und in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase angereichert. Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, durchmischt und zentrifugiert. Während Chloroform Proteine denaturiert und die Phasentrennung erleichtert, fördert Isoamylalkohol das Schäumen und das Ausbilden einer intensiven Interphase. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA wurde durch Ethanol-Natriumacetat gefällt. Dabei wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen 100% Ethanol und einstündiger Inkubation bei -80°C wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und 15 min bei RT getrocknet. Schließlich wurde die DNA in Millipore-Wasser gelöst.

4.4.7.3 Markierung von cDNA Fragmenten durch „Random priming“

Mit Hilfe einer modifizierten Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) können DNA-Fragmente von 100 bis zu mehreren 1000 bp Länge sowohl radioaktiv als auch nicht radioaktiv markiert werden. Radioaktive DNA-Sonden zur Detektion spezifischer RNA-Spezies wurden mit Hilfe des „Prime-a-Gene Labeling Systems“ (Amersham) synthetisiert. In diesem Kit sind bereits Klenow-Polymerase, Zufallshexanukleotide und dNTPs (ohne dCTP) lyophilisiert vorhanden. Ein Reaktionsgefäß mit diesen Komponenten wurden in 35 μl TE-Puffer gelöst. Hierauf wurden 50 ng hitzedenaturierte und auf Eis abgekühlte cDNA pipettiert. Als letztes wurde in einem dafür vorgesehenen Radioaktivraum 5 μl α -[^{32}P]-dCTP (50 μCi , 3000 Ci/mmol) pipettiert und hinter einer Schutzwand 60 min bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurde als Kontrolle die humane β -Aktin-cDNA markiert. Nicht eingebaute

Nukleotide und Primer-Oligonukleotide wurden mit Hilfe von „Qia-Quick“-Säulchen (QIAGEN) laut Angaben des Herstellers entfernt. Das Eluat wurde auf 200 µl mit TE verdünnt. Die Inkorporation von Radioaktivität wurde durch Messung der Cherenkov-Strahlung von 2 µl des Eluats überprüft (siehe Abschnitt 4.4.7.5).

4.4.7.4 Hybridisierung und Detektion von radioaktiv markierten Sonden

Alle Arbeiten mit radioaktiv markierten Sonden wurden in einem Radioaktivlabor durchgeführt. Die Nylonmembran wurde zusammengerollt, damit sich die zu hybridisierende Nucleinsäure innen befindet und in eine Hybridsierröhre entsprechender Größe gesteckt. Die Prähybridisierung erfolgte in der gleichen Lösung, in der anschließend auch die Hybridisierung ablief. Zur Sättigung von unspezifischen Nucleinsäurebindestellen wurde die Membran mit hitzedenaturierter SS-DNA (Salmon Sperm DNA; 10 mg/ml) mindestens 1 Stunde bei 65°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt, anschließend zu der Vorhybridisierungslösung gegeben und über Nacht im Hybridisierungssofen rotierend mit der Membran bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei 65°C 3x mit 2x SSC, 0,1% SDS und 2x für 10 min mit 1 x SSC 0,1% SDS gewaschen. Die Membran wurde mit 2 x SSC gespült und feucht in Plastikfolie eingewickelt. Darauf war zu achten, daß während des Waschvorganges die Membran nicht antrocknet, da ansonsten eine weitere Hybridisierung nicht möglich wäre. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie bzw. mit einem PhosphorImager (Fuji BAS-2500, Fujifilm) sichtbar gemacht und mit der Image Gauge V3.01 Software analysiert.

Bei positiven Ergebnis wurde die auf der Membran noch „haftende“ Radioaktivität entfernt. Dazu wurde eine 0,1% SDS Lösung in Bidest in der Mikrowelle aufgeköcht und die Nylonmembran für ca. 10 min unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde entweder mit einer anderen Sonde inkubiert oder in Frischhaltefolie eingewickelt und bei -20°C gelagert.

4.4.7.5 Radioaktivitätsmessung

Zur quantitativen Messung radioaktiver Proben wird fast ausschließlich die Szintillation benutzt. Bei dieser Technik wird die Energie von Strahlungsquanten in Licht umgewandelt und die Anzahl und Intensität der Lichtimpulse über die Zeit gemessen.

Die radioaktive Probe befindet sich in einem Trägermaterial, ein Plastikröhrchen, mit 1ml Szintillationslösung. Zur Lösung wurden 2 µl der zu messenden Probe pipettiert.

4.5 RNA-Methoden

4.5.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde eine 15 cm Schale 293T- (Human) oder HeLa- (Human) oder NIH3T3-Zellen (Maus) mit einer Konfluenz von 60-70% verwendet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 ml TriPure (Roche, Mannheim) versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Platte gelöst und durch 10-maliges Auf- und Abziehen durch eine Kanüle lysiert. Dabei wurden durch das in TriPure enthaltene Phenol und Guanidinthiocyanat Proteine, also auch RNasen, denaturiert. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Jeweils 1 ml Zelllysate wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, gevortext und nach 10 minütiger Inkubation bei RT zentrifugiert (15 min 14.000 rpm, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt, gevortext und zur Präzipitation der RNA mindestens eine Stunde bei -80°C inkubiert. Danach wurde 30 min zentrifugiert (14.000 rpm 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in frischem Millipore-Wasser gelöst (15 min auf Eis). Nach der Präparation wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Alternativ wurde zur Präparation von RNA das *RNeasy*-Kit verwendet, wobei genau nach Protokoll des Herstellers vorgegangen wurde.

4.5.2 Reverse - Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Bei der RT-PCR erfolgt zuerst eine cDNA-Einzelstrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Die Synthese erfolgte mit Hilfe von Oligo(dT) Primern. Mit Hilfe eines ca. 15-20 bp langen Oligo(dT) Primers, der im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisiert, werden aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle (2-4% der Gesamt-RNA) selektiv in cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkription wurde nach den Angaben des Enzymherstellers (Gibco BRL, Eggenstein) durchgeführt. Dabei wurden 3 µg RNA mit 2 µl OligodT-Primern (0,5 µg/µl) in einem Volumen von 24 µl für 5 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 8 µl 5x Erststrangsynthese-Reaktionspuffer, 4 µl 0,1 M DTT und 2 µl dNTPs (10 mM pro dNTP) versetzt. Anschließend wurde 2 min bei 42°C inkubiert, bevor 2 µl (200 U) *Superscript II*-Enzym zugesetzt wurden. Die cDNA-Synthese erfolgte durch einstündige Inkubation bei 42°C. Abschließend wurde das Enzym durch Erhitzen inaktiviert (15 min 70°C). Die so erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

4.6 Proteinchemische Methoden

4.6.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Präparation von Gesamt-Zelllysaten wurden die Zellen im Medium in der Zellkulturschale mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, 2 min bei 1000x g abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit etwa 5x Volumen des Zellpellets in Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4, 0,2% (v/v) Igepal, 1 mM EDTA und 1,5 mM MgCl₂) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Der Rohextrakt wurde anschließend für 10 min bei 14.000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bei sofortiger Weiterverwendung wurde die Probe mit 2x SDS-Probenpuffer und bei 95°C für 5-10 min aufgeköcht, oder das Rohextrakt wurde bei –80°C eingefroren.

4.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit Hilfe des *Protein Microassay* von BioRad bestimmt (Bradford 1976), um zu gewährleisten, daß gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE eingesetzt werden. Der Nachweis, der nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, beruht auf der Interaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl des Zellextraktes mit 1 ml 1:5 in Wasser verdünntem Reagenz versetzt, für wenige Minuten bei RT inkubiert. Durch Messung der Extinktion bei 595 nm in Vergleich zu einem BSA-Standard konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden. Als Referenzwert diente das Reagenz ohne Probe.

4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS werden die Proteine bei der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgrund ihres Molekulargewichtes während ihrer Wanderung durch die Gelmatrix in Richtung Anode getrennt. Die Probe passiert zunächst ein Sammelgel (4%). Beim Einwandern der Proben in das Trenngel (12% oder 15%), das eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel besitzt, werden die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Vor dem Auftragen wurden die zu ladenden Proteinlösungen mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 20 V/cm.

Trenngel	10%	15%	Sammelgel
ddH ₂ O	4,0 ml	2,3 ml	2,7 ml
30% Acryl-bisacrylamidmix	3,3 ml	5,0 ml	0,67 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,5 ml	2,5 ml	0,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml

Tab. 4.5 SDS-Polyacrylamidgelzusammensetzung

4.6.4 Nachweismethoden für Proteine

4.6.4.1 Coomassie-Blau-Färbung

Coomassie Brilliant Blau ist ein Farbstoff, der unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die Nachweisgrenze für die Färbung mit Coomassie Blau liegt im Bereich von 0,1-2 µg Protein/Bande. Das Sammelgel wurde vom Trenngel abgetrennt und das Polyacrylamidgel in eine mikrowelleneignete Schale mit Coomassie Blau überführt. Die Schale wurde in die Mikrowelle gestellt und die Färbelösung erhitzt. Knapp vor dem Kochen der Färbelösung wurde die Schale aus der Mikrowelle genommen mit einem Deckel abgedeckt und für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Zum Entfärben (25% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure)

wurde das Gel in der Entfärbelösung ebenfalls in der Mikrowelle erhitzt und am Schüttler inkubiert.

4.6.4.2 Ponceau S-Färbung

Die Effizienz des Blotvorganges kann mit Hilfe von Färbereagenzien, die generell Proteine anfärben, überprüft werden. Weit verbreitet ist die Anfärbung mit Ponceau-S-Farbstoff. Ponceau S bietet den Vorteil, daß die Anfärbung nicht permanent ist und daher mit den meisten Nachweisreaktionen und Visualisierungsverfahren kompatibel ist. Dazu wurde die Membran 1 min mit dem Farbstoff Ponceau S (2,5% in PBS) inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T sukzessive entfärbt, sodaß die Proteinmengen in den verschiedenen Spuren des Gels verglichen werden konnten. Hierauf wurde noch 3-4x mit Bidest gewaschen.

4.6.5 Blotten: Elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-Verfahren (Western Blot)

Unmittelbar nach Abschluß der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Standardverfahren im Blotten ist nach wie vor der elektrophoretische Transfer, wo die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Membran überführt werden. Zum Blotten wurde eine PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm verwendet. Zum einen besitzt sie eine sehr hohe Proteinbindekapazität von bis zu 600 g/cm^2 , eine gute Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln, eine hohe Reißfestigkeit und ein gutes Signal/Hintergrundverhältnis mit Chemilumineszenz-Detektionssystemen.

Für den Aufbau wurden zuerst zwei Lagen in Transferpuffer getränkte „Whatman“-Filterpapiere in die Blotkammer gelegt sowie die vorher in Methanol aktivierte Hybond ECL Membran (Amersham) darüberplaziert, dann folgte das Gel und drei weitere Lagen befeuchtete Filterpapiere. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 für 1 h.

4.6.6 Nachweisreaktion: Bindung der Erst-und Zweitantikörper

Vor Beginn der Nachweisreaktion müssen Protein-Blots abgesättigt werden. Dieses Blocken dient dazu, überschüssige Proteinbindestellen in der Membran zu saturieren und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Dazu wurde die Membran mit 5% Magermilchpulver in TBS-T bei 4°C über Nacht oder 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h bei Raumtemperatur in einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers (bei Saip 1:2500) in 5% Magermilchpulver in TBS-T inkubiert. Die Membran wurde dann fünf - sechsmal für je 10 min in TBS-T gewaschen und mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten, Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (HRP-gekoppelt) für mindestens 2 Stunden bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend mehrmals in TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte über Inkubation mit ECL-Lösung und anschließender Exposition gegen einen Röntgenfilm. Bei sehr schwachen Signalen wurde die Detektion mit dem „*Supersignal West Femto*“-System wiederholt.

4.6.7 Visualisierung von Proteinen mittels Chemilumineszenzreaktion

Die durch den sekundären Antikörper markierten Proteine wurden durch eine Meerrettichperoxidase (HRP)-katalysierte Chemilumineszenzreaktion (*enhanced chemiluminescence* ECL) nachgewiesen. Hierzu wurde das *Super signal West pico chemiluminesenz*-Substrat (5 µl, 6,8 mM p-Curcuminsäure in DMSO mit 5 ml, 1,25 mM Luminol sowie 1,5 µl 30% H₂O₂) bzw. bei schwachen Signalen das *Super signal West femto maximum sensitivity*-Substrat von Pierce (Rockford, USA) verwendet. Dazu wurden in einer Dunkelkammer gleiche Teile der ECL-Lösungen A und B gemischt und auf die mit Antikörpern behandelte Membran gegeben. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt, um das Ergebnis des Western-Blots zu dokumentieren.

4.6.8 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine (GST)

Für die Gewinnung eines rekombinanten GST-Fusionsproteins wurde das Expressions-Kit „pET Expression System“ von Stratagene benutzt. Das Gen wurde *in-frame* in pET11d kloniert. Es wurden chemokompetente BL21-Zellen mit dem Plasmid transformiert und auf Agar-Platten ausgestrichen. Nach Über-Nacht-Inkubation wurden einzelne Klone gepickt und in 1 ml LB_{Amp}-Medium aufgenommen. Diese Vorkultur wurde mindestens für 16 h bei 37°C geschüttelt. Mit der so erhaltenen Vorkultur wurde 500 ml LB_{Amp}-Medium angeimpft und solange bei 37°C geschüttelt, bis die OD_{600nm} ca. 0,5 betrug. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert und die Bakterienkultur für weitere 3 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden dann für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml PBS (+ 2 mM EDTA) resuspendiert.

Die so erhaltene Zellsuspension wurde für 10 min auf Eis mit 2 ml Lysozym (10 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 min bei gleichzeitiger Kühlung sonifiziert (500 U/min). Das Zell-Lysat wurde 30 min bei 45.000 x g ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 7 ml PBS (+1,5% Triton-X 100) resuspendiert, in ein Falconröhrchen überführt und für 15 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde mit 2 ml GSH-Sepharose (Stratagene) versetzt und für 2 h am Drehrad bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde für 5 min bei 2.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 ml PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde mit 1 ml GSH (Stratagene) resuspendiert und 10 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde 5 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand bei -80°C weggefroren oder weiterverarbeitet. Zur Affinitätsreinigung wurde der Zentrifugationsüberstand mit ca. 1 mg Glutathion-Sepharose (Stratagene) pro 10 mg rekombinantem Protein versetzt und 1-2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Bakterienlysate auf eine Säule mit Filtereinsatz zur Abtrennung der GSH-Sepharose gegeben, die Sepharose dreimal mit Resuspensionspuffer gewaschen und dann mit 50 mM reduziertem Glutathion in PBS (pH 7,4) eluiert. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE/Immunoblot analysiert und gegebenenfalls eingeeengt (Centricon, Zentrifugationseinheiten, Ultrafiltration mit Amicon Ultrafiltrationszelle).

4.6.9 Immunpräzipitation von Proteinen

Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern wurden durchgeführt, um ein bestimmtes Protein zu präzipitieren und die *in vivo* an dieses Protein assoziierten Proteine aus Gesamtzellextrakten zu identifizieren. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen mit Proteaseinhibitoren ausgeführt. Für Immunpräzipitationen wurden transfizierte 293T-Zellen aus einer 10 cm-Kulturschale verwendet (10 µg DNA und 2,5 µg GFP). Zur Präparation von Gesamt-Zellysaten wurden die Zellen direkt im Medium vorsichtig mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, 2 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 600 µl IP-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Das Rohextrakt wurde anschließend für 10 min bei 13000 g und 4°C abzentrifugiert. 30-40 µl des Rohextraktes wurden zum Testen des Inputs der Immunpräzipitation abgenommen sofort mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht; der Großteil des Extraktes wurde entsprechend dem Experiment auf die anderen Eppendorfröhrchen aufgeteilt. Zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden 4 µg spezifische Antikörper (HA oder myc Antikörper) für 3-5 h auf einem Überkopfschüttler im Kühlraum (4°C) bei langsamer Rotation inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Spatelspitze (ca. 10 mg) Protein A Sepharose in 1ml IP-Puffer für ca. 20 min auf Eis gelöst. Zu den Eppendorfröhrchen wurden jeweils 100 µl der gelösten Protein A Sepharose pipettiert und noch mal für eine Stunde am Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 1 ml IP-Puffer aufgefüllt und für 10 min am Drehrad bei 4°C inkubiert. Dieser Vorgang wurde 4x wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand bis auf 100 µl dekantiert mit 100 µl SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min aufgeköcht und mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert.

4.6.10 Immunfluoreszenz

Proteine, die in eukaryontischen Zellen nach Transfektion von cDNA exprimiert wurden, konnten nach Fixierung der Zellen *in situ* durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Auf diese Weise können auch endogene Proteine nachgewiesen werden. Für die Versuche wurden Zellen auf sterilen Deckgläsern in 6-Well Kulturschalen ausgesät. Vierzehn Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 5 min in 3,7% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min in 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert, erneut gewaschen und mit einer 50 μ M DAPI-Lösung in Methanol für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Methanol und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit dem Antiserum oder dem Präimmunserum für eine Stunde bei 37°C in einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit 10% FKS inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 in PBS bei 37°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde anti-Kaninchen IgG aus Schaf, gekoppelt mit FITC verwendet. Die Zellen wurden nach der Inkubation drei- bis fünfmal mit PBS gewaschen, dann aus den Zellkulturschalen genommen und luftblasenfrei auf einen Tropfen Glycerin (ca. 87%) auf einem Objektträger aufgelegt und leicht angedrückt. Die Präparate wurden in Alufolie eingewickelt, bei 4°C gelagert und anschließend fotografiert.

4.6.11 Aktivitätsmessungen der Atmungskettenkomplexe

4.6.11.1 Isolierung der Mitochondrien

Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte nach (Gawaz 1990) einem Standardprotokoll. Dazu wurden 293T-Zellen mit je 10 μ g DNA und 1 μ g GFP in 10cm Schalen transfiziert. Acht Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellsuspension wurde 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet in 600 μ l Lysepuffer resuspendiert.

Puffer A:	20 mM Hepes 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA	Lysepuffer:	12 ml Puffer A 3 ml 1,25 M Sucrose 1 Tabl. Mini Complete
-----------	--	-------------	--

Anschließend wurde die Zellsuspension in einen Glasdouncer (Cole Parmer Instruments Co.) überführt und je 15x auf Eis „gedouncet“. Das Zellysate wurde dann 15 min auf Eis inkubiert. Hierauf wurde zweimal für 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Überstände jeweils in neue Eppendorf-Cups überführt. Anschließend wurde nochmals für 10 min bei 9600 rpm und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Mitochondrienpellet wurde in 75 µl Puffer A aufgenommen und die Gesamtproteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

4.6.11.2 Aktivitätsmessung von Komplex I

Der Messpuffer wurde 5 min vor der Messung bei 37°C vorinkubiert, danach wurden 5 µg DNA Gesamtprotein zugegeben, vermischt, 3 min bei 37°C vorinkubiert und dann im Photometer die Absorption bei 600 nm bestimmt. Die Anfangsabsorption wurde auf Null gesetzt und alle 10 sec wurde über eine Zeitdauer von 3 min ein Messwert ermittelt.

Hierauf wurde der Komplex durch Zugabe von Rotenon (5 µM) inhibiert, und wiederum die Absorption über eine Zeitdauer von 3 min gemessen.

Messpuffer:

35 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,2
5 mM MgCl₂
2 mM KCN
88 µM DCPIP
2 µg /ml Antimycin A
60 µM Coenzym Q₂
130 µM NADH

4.6.11.3 Aktivitätsbestimmung von Komplex II

Die Aktivität von Komplex II wurde spektralanalytisch gemessen (Vinogradoc et al. 1980). Die intakten, isolierten Mitochondrien oxidieren über Komplex II Succinat zu Fumarat und übertragen die Elektronen im Testansatz auf Dodecylbenzochinon. Letzteres ist durch überlagernde Absorptionsmaxima nicht gut messbar. Daher wird dem Testansatz der Farbstoff Dichlorphenolindophenol (DCPIP) zugesetzt. Dieser reoxidiert das Dodecylbenzochinon, welches dadurch wieder als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. Die Reaktion wird verfolgt, indem die durch Reduktion des DCPIP verursachte Extinktionsabnahme bei 600 nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wird. Die Messungen wurden in 1 ml Küvetten der Schichtdicke 1 cm bei RT durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe der isolierten Mitochondrien, wobei pro Messung ein Gesamtproteingehalt von 5 µg eingesetzt wurde. Für die Messung wurde über einen Zeitraum von 20 min alle 15 sec ein Messwert genommen.

Messpuffer:

35 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,2
5 mM Mg Cl₂
2 mM KCN
88 µM DCPIP
2 µg /ml Antimycin A
100 µM Coenzym Q₂
25 mM Na-Succinat

4.6.11.4 Succinatdehydrogenasemessung (SDH)

Die Succinatdehydrogenase ist ein oligomeres Flavinenzym des Citratzyklus, das die Oxidation des Succinats zum Fumarat katalysiert. Das dabei gebildete FADH₂ gibt seinen Wasserstoff in der Atmungskette an Ubichinon ab (siehe auch Abschnitt 4.6.11.3).

Hierzu wurden 5 µg Gesamtprotein in den vorgewärmten Messpuffer gegeben und die Absorption bei 600nm alle 15 sec über einen Zeitraum von 15 min gemessen.

Messpuffer:

35 mM Kaliumphosphat – Puffer pH 7,2
40 μ M DCPIP
10 mM Na-Succinat
1,6 mM PMS

4.7 Zellbiologische Methoden

4.7.1 Methoden zum Nachweis der Apoptose

4.7.1.1 DNA-Leiter

Der Nachweis der Apoptose über die DNA Fragmentierung ist die gängigste Methode in der Apoptoseforschung. Dazu wurde eine 10 cm Schale 293T-Zellen mit dem zu untersuchenden Plasmid transfiziert. Nachdem die Apoptose eingetreten war, wurden die Zellen abgeschabt, für 10 min bei 800 g, 4°C zentrifugiert und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Es wurden 500 µl Phenol zugesetzt und 1 min gevortext. Anschließend wurde 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und es wurden 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt. Nachdem 1 min gevortext worden war, wurde für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und es wurden 30 µl 5 M NaCl und 1 ml kalter Ethanol zugesetzt. Die Lösung wurde gevortext und für 30 min bei –80°C gelagert. Anschließend wurde für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 300 µl kaltem, 70 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl TE-Puffer aufgenommen und 30 min bei 50°C inkubiert. Dann wurden 3 µl RNase A (10 mg/ml) zugesetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde im gleichen Volumen Ladepuffer aufgenommen und auf einem 2%-igen Agarose-Gel bei 60 V aufgetrennt (Visualisierung der Banden siehe Abschnitt 4.7.8)

4.7.1.2 MTT-Test zur Zellzahlbestimmung

Da die Enzymaktivität einer lebenden Zelllinie mit der Zellzahl in einem Ansatz ansteigt, ist es möglich, die relative Anzahl an Zellen mit Hilfe eines Enzymtests zu ermitteln. Hierfür wurde der sogenannte MTT-Test verwendet, der auf der Reduktion des Farbstoffs 3-(4,5-dimethylthiazol-2,5)-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale

Dehydrogenasen basiert. Das dabei entstehende Formazanblau kann spektrophotometrisch nachgewiesen werden (Hansen et al. 1989). Der Test wurde im 96-*well* Format durchgeführt. Dazu wurden 10.000 Zellen pro *well* pipettiert. Für den Test wurden 100 µl Zellsuspension mit 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) versetzt und für 3 bis 5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der dabei entstehende blaue Farbstoff wurde mit Isopropanol aufgelöst (100 µl Isopropanol mit 4% 1N HCl zur Entfärbung des im Medium enthaltenen Phenolrots) und mit Hilfe eines ELISA-Plattenlesers quantifiziert (Dynatech MR7000, Testfilter 590 nm; Referenzfilter 750 nm).

4.7.1.3 Nachweis hypodiploider DNA

Bedingt durch die internukleosomale Spaltung der DNA verlieren die Zellkerne im Verlauf der Apoptose zunehmend DNA. Ihr DNA-Gehalt sinkt somit und wird hypodiploid (Vermes et al. 2000). Der Anteil der Zellkerne mit hypodiploider, sogenannter Sub-G₁-DNA, wurde durchflusszytometrisch nach Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid bestimmt (Bauer et al. 1999). Dazu wurden nach geeigneten Apoptose-Induktionszeiten die Zellüberstände ebenso wie die durch Trypsinieren geernteten Zellen abzentrifugiert (10 min 1.500 g 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, um keine apoptotischen Zellen zu verlieren. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Falls in den Ansätzen GFP kotransfiziert war, wurden 100 µl der Zellsuspension abgenommen und zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendet. Der Rest der Zellsuspension wurde mit 1,5 Volumen hypotonem PI-Lyse-Puffer (0,1% Na₃Citrat, 0,1% Triton X-100, 20 µg/ml Propidiumiodid in PBS) versetzt. Dadurch wurden die Zellen lysiert, die Kerne freigesetzt und die DNA durch das im Puffer enthaltene Propidiumiodid angefärbt.

Die so präparierten Zellen wurden nun im Durchflusszytometer im Kanal FL2 mit dem Programm „*Cellquest*“ analysiert. Dabei wurden je nach Anzahl der Parallelmessungen zwischen 5000 und 10.000 Zellen pro Probe vermessen. Zur Bestimmung des Anteils von Zellkernen mit hypodiploider DNA in einer Probe wurden die Messergebnisse als Histogramm dargestellt und der Anteil von Kernen mit Sub-G₁-DNA in Relation zu der Gesamtheit der Kerne (Kerne in Sub-G₁, G₁, S und G₂) gesetzt.

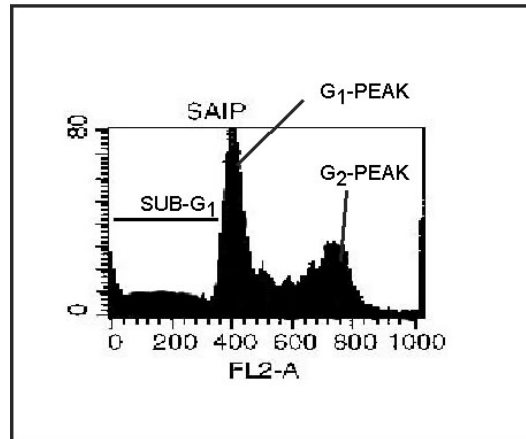


Abb.4.1 Beispiel eines FACS-Profiles (*Fluorescence activated cell sorting*) anhand von Saip

4.7.1.4 Caspase-3 Aktivitätsassay

Hierzu wurden die Zellen im 6 *well* Format gesplittet und tags darauf mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert und 2x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Caspase-3 Puffer aufgenommen (2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin, 1% DTT) und 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt (siehe Abschnitt 4.7.2). Eine 96 *well* Platte wurde mit Caspase-8 Antikörper (1 µg/ml) beschichtet. Dazu wurde der Antikörper in Antikörper - Beschichtungspuffer (50 mM Na₂CO₃, pH 9.6) gelöst und pro *well* 100 µl pipettiert. Die Platte wurde dann für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Der Antikörper wurde dekantiert und die restlichen Bindungsstellen mit 3% BSA 30 min bei RT blockiert. Die Blockierlösung wurde dekantiert und 3x mit Caspase-3 Puffer (10 mM DTT) gewaschen. Pro *well* wurde auf 150 µl Puffer vorgelegt und anschließend 100 µg Protein pro *well* pipettiert. Die Platte wurde hierauf für 60 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Das Protein wurde wieder dekantiert und 3x mit Caspase-3 Puffer gewaschen. Für die Substratinkubation wurde für die gesamte Platte 2,5 ml Caspasepuffer mit 10 mM DTT und 1 µg/ml Substrat für Caspase-3 (DEVD) zusammenpipettiert. Die Platte wurde im Dunklen 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem Fluoreszenzplattenleser (Fluoroskan Ascent FL Fluorescence, Labsystems bei einer Anregungswellenlänge von 380nm ausgewertet.

Beschichtungspuffer (Caspase-3 Puffer pH 7,2)

10 mM HEPES
50 mM KCl
5 mM EGTA
2 mM MgCl₂
0,5% NP40

5 ERGEBNISSE

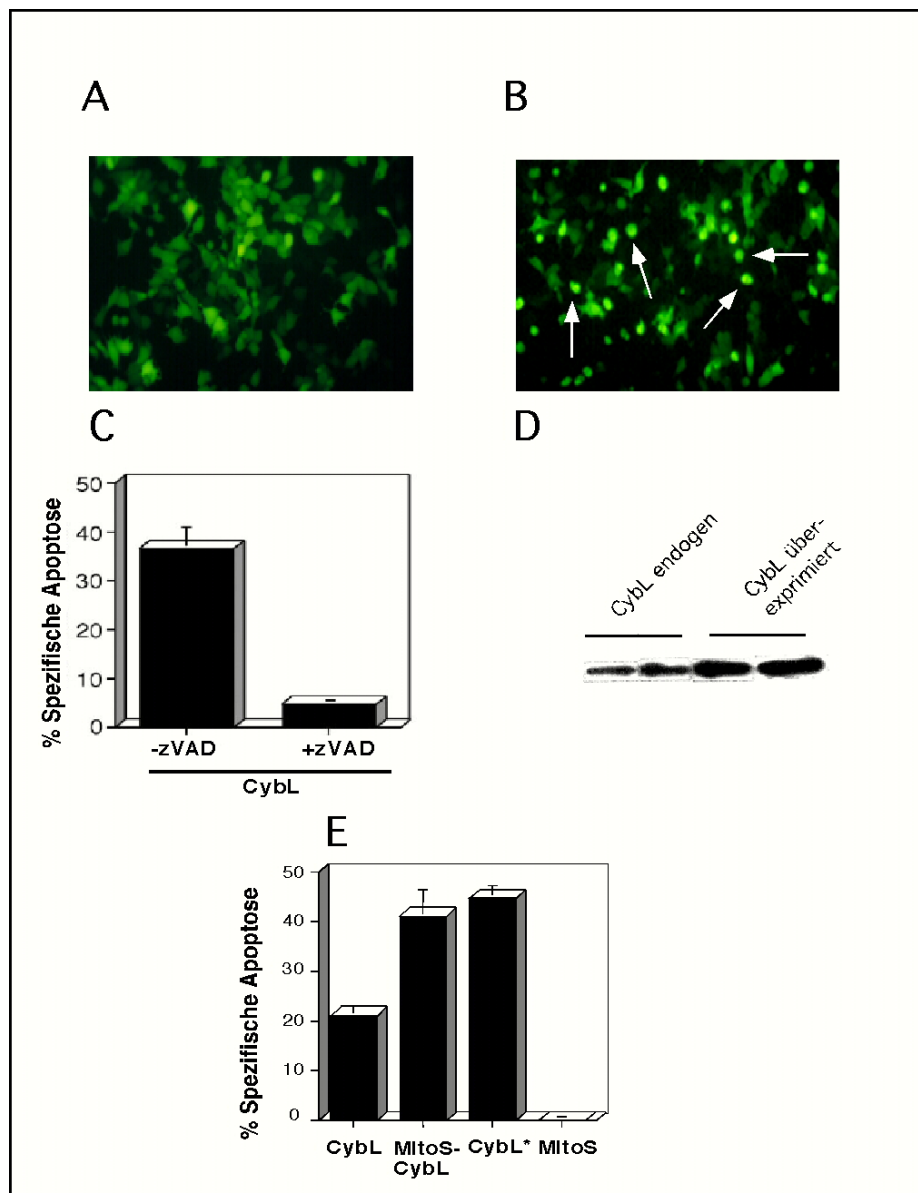
5.1 CybL, ein Bestandteil der Atmungskette, induziert caspasenvermittelte Apoptose

Bei Cytochrom bL (CybL), in der Literatur als auch als C_{II-3} oder QPS-1 beschrieben, handelt es sich um ein Protein der inneren Mitochondrienmembran. Es fungiert dort als Anker für andere Komponenten von Komplex II der Atmungskette, und wurde als Tumorsuppressor-Gen beschrieben (Baysal et al. 2000).

Mit CybL wurde ein Gen von Komplex II durch den *Screen* identifiziert, das bei Überexpression in Säugetierzellen Zelltod induziert (Siehe Abb. 5.1.1; A,B). Um zu testen, ob die von CybL ausgelöste Induktion auf Apoptose zurückzuführen ist, wurde CybL in 293T-Zellen überexprimiert und mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk gehemmt. Die Apoptoseinduktion wird eindeutig reprimiert und ist somit ein Hinweis für caspasenvermittelte Apoptose (Abb. 5.1.1; C). Zudem reicht eine 3,8-fache Überexpression von CybL gegenüber dem endogenen Level aus, um nach 16 h Apoptose induzieren zu können (Abb. 5.1.1; D).

Alle Untereinheiten des Proteinkomplexes II sind durch Gene kodiert, die im Zellkern lokalisiert sind. Die einzelnen Proteine werden im Zytoplasma synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert. Bei CybL handelt es sich um eine Splice-Isoform, der das zweite beschriebene Exon (Aminosäure 8-26) fehlt, die als mitochondriale Zielsequenz beschrieben worden ist (Elbeheti-Green et al. 1998). Proteine, die sich im Zytosol befinden, benötigen jedoch für den Transport in die Mitochondrien diese Zielsequenz. Um zu testen, ob die Mitochondrien an CybL vermittelter Apoptose beteiligt sind, wurde ein Fusionsprotein aus der mitochondrialen Zielsequenz von Cyclophilin D (Aminosäure 8-26) und CybL in 293T-Zellen überexprimiert, und die dadurch induzierte Apoptose quantifiziert. Durch diese N-terminale Fusionierung der mitochondrialen Importsequenz wird die Apoptoseinduktion um 55% erhöht (Abb. 5.1.1; E).

Der zusätzliche Importweg, der durch die mitochondriale Importsequenz von Cyclophilin D eröffnet wird, ist vermutlich für einen vermehrten Import des überexprimierten CybL in die Mitochondrien verantwortlich. Der durch CybL vermittelte Apoptose-induzierende Stimulus ist somit wahrscheinlich in den Mitochondrien lokalisiert.

**Abb. 5.1.1**

Überexpression von CybL führt zur Apoptoseinduktion. 293T-Zellen wurden mit Luciferase (Kontrolle, A) bzw. 4 µg CybL und 1 µg pEGFP (B) im 6 well-Format transfiziert. 26 h nach Transfektion wurden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen (A,B). (↑) weisen auf apoptotische Zellen hin. (C). Für die Inhibition mit zVAD-fmk wurden wie unter (A,B) 293T-Zellen mit CybL transfiziert. Nach 8-stündiger Inkubation wurden die Zellen 2x mit 1xPBS gewaschen und 2 ml frisches DMEM mit allen Zusätzen hinzugefügt. Zur Inhibition der Apoptose wurde zu einem Ansatz 50 µM zVAD-fmk pipettiert. Die Zellen wurden weitere 30 Stunden inkubiert und mittels FACS-Analyse die Apoptoseinhibitor bestimmt. (D). HeLa WT-Zellen wurden mit 800 ng CybL und 200 ng pEGFP kotransfiziert. Nach 16 stündiger Inkubation (noch vor Auftreten von Apoptose) wurden die Zellen geerntet und 80 µg Protein auf ein 16% SDS-Gel aufgetragen und geblottet (jeweils 2 Parallelen). Als Kontrolle dienten nichttransfizierte HeLa WT-Zellen. Inkubiert wurde mit einem CybL Antikörper von Brian Ackrell. In Abbildung (E) wurden 4 µg CybL, 4 µg CybL mit der fusionierten mitochondrialen Zielsequenz von Cyclophilin D (MitoS-CybL), CybL mit der aus dem Screen enthaltenen mitochondrialen Sequenz (CybL), eine längere Spliceform von CybL (CybL*) und die mitochondriale Zielsequenz alleine (MitoS; Kontrolle) transfiziert und nach 26 h mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die Kontrolle wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

5.1.1 Beteiligung der Atmungskette an CybL vermittelter Apoptose

Mitochondrien sind notwendig für die Energieproduktion in der Zelle. Sie beeinhalteten ihre eigene DNA (mtDNA), die für 13 Komponenten der Atmungskette kodiert. Um zu testen, ob für CybL-induzierte Apoptose eine intakte Atmungskette notwendig ist, wurden als Modell HeLa $\rho 0$ -Zellen verwendet. HeLa $\rho 0$ -Zellen gehen aus HeLa Wildtyp (WT)-Zellen hervor, indem sie über eine längere Periode (3-4 Monate) mit Ethidiumbromid behandelt werden. Dadurch wird die mitochondriale DNA (mtDNA) zerstört, die Mitochondrien bleiben jedoch intakt (Jiang et al. 1999). Die Zellen verfügen somit nicht mehr über eine intakte Atmungskette. CybL wurde sowohl in HeLa WT- als auch in HeLa $\rho 0$ -Zellen überexprimiert und nach 26 Stunden wurde die Apoptoseinduktion bestimmt. CybL induziert in HeLa Wildtyp-Zellen mit einer Effizienz von 38% Apoptose, in HeLa $\rho 0$ -Zellen dagegen nur 2% spezifische Apoptose. Als Kontrolle diente Caspase-2, die in beiden Zelllinien Apoptose unabhängig von einer intakten Atmungskette induziert. In der Zelllinie ohne intakte Atmungskette kann CybL also keine Apoptose induzieren.

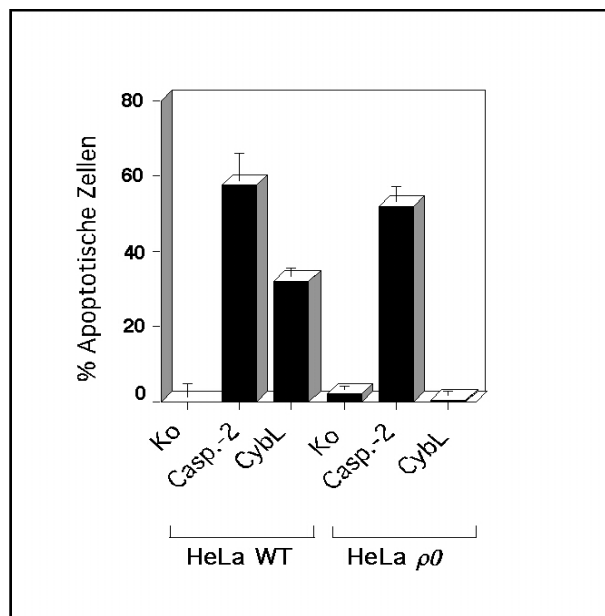


Abb. 5.1.2

Funktion der mitochondrialen Atmungskette für die Apoptoseinduktion durch CybL. HeLa WT- und HeLa $\rho 0$ -Zellen, die Mitochondrien ohne mtDNA beeinhalteten, wurden mit einem Kontrollplasmid, CybL, Caspase-2 und pEGFP kotransfiziert. 26 h nach Transfektion wurde die Apoptoserate in den GFP-positiven Zellen durch Auszählen bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

5.1.2 Einfluß von CybL-Expression auf Komplex I und Komplex II der Atmungskette

Da CybL, ein Bestandteil von Komplex II, bei Überexpression Apoptose induziert, lag die Frage nahe, ob dadurch auch die Aktivität von Komplex II bzw. Komplex I der Atmungskette beeinflusst wird. Um zu testen, wie spezifisch überexprimiertes CybL Komplex II der Atmungskette reprimiert, wurde die Aktivität von Komplex II und Komplex I der Atmungskette gemessen. Dazu wurde CybL durch Kotransfektion mit GFP in 293T-Zellen überexprimiert. Abbildung 5.1.3 zeigt, daß CybL-Expression nur Komplex II in der Aktivität beeinflusst jedoch nicht Komplex I (Abb. 5.1.3; A,B). Die enzymatische Aktivität von Komplex II beinhaltet sowohl die Succinatdehydrogenase- (SDH) Reaktion, die Succinat oxidiert, als auch den Transfer der Elektronen an Ubichinon (Coenzym Q Reduktase-Aktivität). Die Messung der Succinatdehydrogenase wurde gemäß dem Protokoll von Hatefi durchgeführt (Hatefi 1978), das 2,6-dichloroindophenol (DCIP) - gekoppelt mit der Succinatoxidation - durch den Vermittler Phenazinmethosulfat reduziert. Wurde Cytochrom c als Elektronenakzeptor benutzt, um die Komplex II-Aktivität zu messen, wurde das Protokoll von Schmidt (Schmidt et al. 1992) angewendet, das die succinatabhängige, malonatsensitive Reduktion von Cytochrom c detektiert. Ein weiterer Assay, der Cytochrom c als Elektronenakzeptor für Komplex II benützt, zeigt eine Erniedrigung von Komplex II nach CybL Transfektion, die auch nach Zugabe vom Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk unverändert blieb. Es konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von CybL nur die Komplex II-Aktivität reduziert, wohingegen die Succinatdehydrogenase-Aktivität unverändert bleibt (siehe Abb. 5.1.3; B,C). Daraus kann geschlossen werden, daß das Eisenschwefelprotein und das Flavinprotein (weitere Komponenten von Komplex II) unverändert bleiben, und daß CybL zur Entkopplung des Elektronentransfers zu Ubichinon führt. In den B9-Zellen war sowohl die SDH-Aktivität als auch die Komplex II-Aktivität reduziert, verglichen mit den B30-Zellen in denen Komplex II aktiv ist (Abb. 5.1.3; D,E) (Vgl. Abschnitt 5.1.4). Man geht davon aus, daß eine Blockierung von Komplex II auch den Krebszyklus stoppt, da der Krebszyklus das notwendige Succinat für Komplex II liefert. Abbildung 5.1.4 (A,B) zeigt, daß die zwei Komponenten des Krebszyklus, Succinat und Citrat erhöht sind verglichen mit kontrolltransfizierten Zellen. Glutamat, eine Aminosäure, die nur indirekt vom Krebszyklus

entsteht (durch α -Ketoglutarat und NADH^+), war nicht signifikant hochreguliert (siehe Abb. 5.1.4; C).

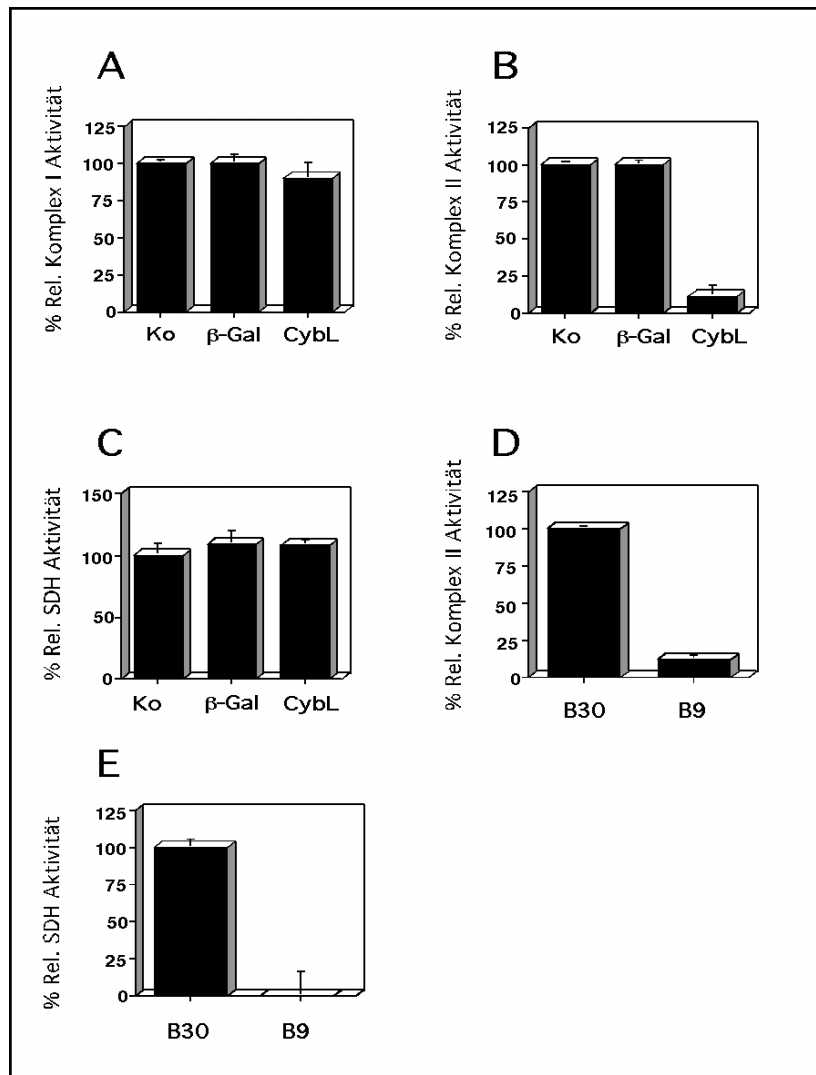


Abb. 5.1.3

Einfluß der Überexpression von CybL auf verschiedene Komplexe der Atmungskette (A,B,C), sowie Messung der Komplex II- und SDH-Aktivität von B9/B30 Zellen (D,E). In 10 cm Schalen wurden 293T-Zellen mit den angegebenen Plasmiden (10 µg) oder mit β -Galactosidase (β -Gal) oder CybL transfiziert. Nach 16 stündiger Inkubation wurden die Zellen abtrypsiniert und aufgeschlossen. (A). Zeigt die Auswirkung der überexprimierten Plasmide auf die Komplex I- (B). Komplex II- und (C) SDH-Aktivität. Dargestellt sind die Aktivitäten der einzelnen Komplexe normalisiert auf die Transfektionseffizienz, sowie die unbehandelte Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung. (D),(E). Komplex II-Aktivität in B9- und B30-Zellen. (D). Angegeben ist die Komplex II-Aktivität in B9- und B30-Zellen bzw. die Succinatdehydrogenaseaktivität von drei unabhängigen Experimenten. (Diese Abbildung ist in Zusammenarbeit mit Herrn Frank Voß entstanden).

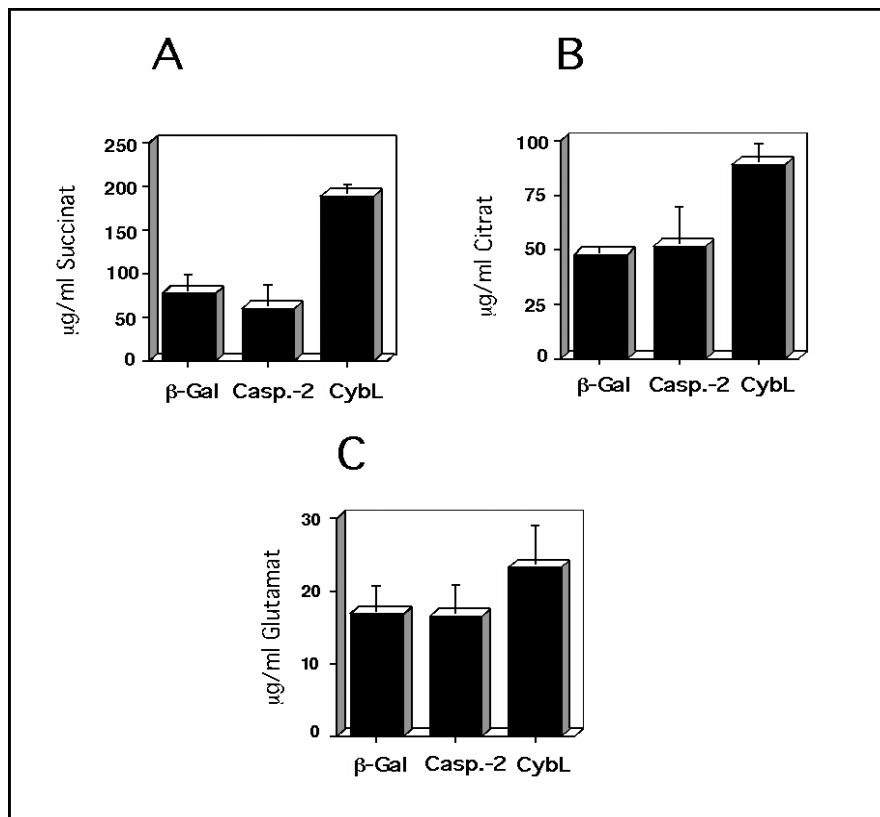


Abb. 5.1.4

Einfluß der CybL Überexpression auf die Bildung von Succinat (A), Citrat (B) und Glutamat (C). 293T-Zellen wurden im 6 well-Format mit β -Gal, Caspase-2 und CybL und pEGFP kotransfiziert. Nach 16 h wurde die enzymatische Konzentration photometrisch gemessen. Die ermittelten Konzentrationen wurden auf die Transfektionseffizienz normalisiert und sind als drei unabhängige Experimente dargestellt (In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stefan Grimm).

5.1.3 CybL ist neben CybS die einzige Untereinheit von Komplex II die Apoptose induziert

Da der Gesamtlängenklon von CybL Apoptose induziert, und Komplex II in seiner Aktivität inhibiert, wurde getestet, ob die Transmembrandomänen von CybL für die apoptoseinduzierende Eigenschaft notwendig sind. Zusätzlich sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden, ob auch die anderen Untereinheiten von Komplex II (CybS, FeS und FAD), die bisher noch nicht mit Apoptose in Verbindung gebracht worden sind, ebenfalls Apoptose induzieren können.

Laut Datenbankvorhersage besteht CybL aus vier Transmembrandomänen (TMD). Mit spezifisch gewählten Primern wurde jeweils eine Transmembrandomäne deletiert. So entstanden 4 Konstrukte ($C_{II-3} \Delta 1TM-\Delta 4TM$). Diese vier Konstrukte wurden in 293T-Zellen transfiziert. Die anderen Untereinheiten von Komplex II, das Eisen-Schwefelprotein (FeS, human) und das Flavinprotein (FAD, human), wurden als HA-Konstrukte kloniert, und ebenfalls in 293T-Zellen überexprimiert. Nach quantitativer Bestimmung der Apoptose mittels FACS-Analyse war nur der Gesamtlängenklon von CybL und CybS, die kleinere Untereinheit von Komplex II, in der Lage, Apoptose zu induzieren. Alle Transmembrandomänen sind somit für die apoptoseinduzierende Eigenschaft notwendig. Das Eisenschwefelprotein (FeS) und das Flavinprotein (FAD) konnten jedoch keine Apoptose auslösen (siehe Abb. 5.1.5; A,B). Da CybL bei Überexpression, Apoptose induziert, wurde getestet, ob eine Korrelation zwischen der transienten Inhibition von Komplex II durch CybL und Inhibition durch TTFA (Thenoyltrifluoroacetone), besteht. TTFA ist ein effizienter Inhibitor von Komplex II (Sun et al. 1984) und induziert, ähnlich wie CybL, nach Inkubation 40% Apoptose in HeLa-Zellen (siehe Abbildung 5.1.5; C).

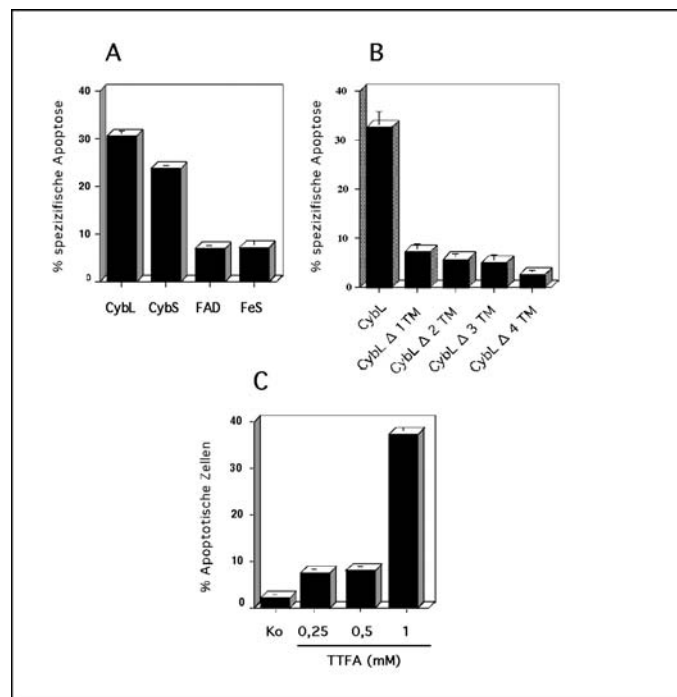


Abb. 5.1.5

Bestimmung der Apoptoseinduktion durch die Expression der Untereinheiten von Komplex II bzw. der Deletionsmutanten von CybL. (A),(B). 293T-Zellen wurden im 6 well-Format mit 4 μ g des jeweiligen Konstruktes (FAD, FeS, CybS) und mit 1 μ g pEGFP kotransfiziert und nach 26 h ausgewertet. (B). Apoptoseinduktion der Deletionsmutanten von CybL. Transfektion und Auswertung wie unter (A) beschrieben. (C). Bestimmung der Apoptoseinduktion durch den Komplex II-Inhibitor TTFA in HeLa-Zellen. Für die Apoptoseinduktion durch TTFA wurden 293T-Zellen mit

unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM) induziert. Die Bestimmung der Apoptoseinduktion wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

5.1.4 CybL defiziente-Zellen sind resistent gegenüber Cytostatika-induzierter und Fas-Rezeptor induzierter Apoptose

Die Ergebnisse, daß CybL bei Überexpression Apoptose induziert, lassen die Vermutung zu, daß Komplex II einen wichtigen Beitrag bei Inhibition zur Apoptoseinduktion leisten könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurden die B9/B30 Zellen mit diversen Cytostatika behandelt, die bekanntermaßen Apoptose induzieren, allerdings dabei unterschiedliche Signalwege aktivieren. Tabelle 5.1.2 zeigt die Wirkungsweise der verwendeten Cytostatika in den eingesetzten Konzentrationen. B9/B30 Zellen sind Lungenfibroblasten aus Hamsterzellen in denen CybL funktionell nicht aktiv ist (B9); wohingegen die B30-Zellen ein Fusionsprotein zwischen CybL und GFP enthalten, welches die physiologische Aktivität von Komplex II wiederherstellt. Diese Zellen wurden von Prof. Immo Scheffler (University of San Diego, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt.

Cytostatikum	Konzentration	Proapoptotische Wirkungsweise
Arsentrioxid	4 µM	Fördert die Bildung sogenannter „ <i>Nuclear Bodies</i> “
Cis-Platin	4 µM	Aktiviert p53 und führt zur Bildung von ROI
Doxorubicin	40 µM	Entkoppelt Komplex I und führt zur ROI- (Reaktive Sauerstoffintermediate) Bildung
Etoposid	4 µM	Topoisomerase II Inhibitor
Menadion	400 nM	Entkoppelt den Elektronentransport der Atmungskette und überträgt Elektronen von Komplex I auf Komplex IV
Paclitaxel (Taxol)	30 µM	Inhibitor der Tubulinassemblierung

Tab. 5.1.2 Wirkungsweise der Cytostatika

Die Abbildung 5.1.6 zeigt, daß die B9-Zellen gegenüber Cytostatika-Behandlung resistenter als die B30-Zellen sind. Die Repression der Apoptoseinduktion belief sich zwischen 61% durch Paclitaxel bis 90% durch Etoposid und Doxorubicin; mit Ausnahme von Arsentrioxid, daß in beiden Zelllinien annähernd gleich stark Apoptose induziert. Ein weiterer Beweis dafür,

daß CybL einerseits eine essentielle Rolle in der Apoptoseinduktion spielt, und zum anderen, daß viele der getesteten Cytostatika einen funktionell aktiven Komplex II benötigen (siehe Abb. 5.1.6). Ein vergleichbarer Unterschied in der Apoptoseinduktion konnte mit Doxorubicin mittels Caspase-Aktivitätsassay gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Da an apoptotischen Prozessen auch Membranrezeptoren beteiligt sein können, wurden neben den Cytostatika auch zelluläre Membranrezeptoren, die Apoptose vermitteln können, getestet. Zum einem wurde ein Antikörper gegen den Fas-Rezeptor verwendet (Nagata et al. 1995), zum anderen der humane Ligand für den TNF-Rezeptor (Wallach 1997). In den B9-Zellen ließ sich eine Apoptosereduktion von 77% nachweisen nach Behandlung mit dem Fas-Rezeptor verglichen mit den B30-Zellen, die über eine „intakte“ Atmungskette verfügen (siehe Abb. 5.1.7). TNF hingegen war in beiden Zelllinien in der Lage, gleich stark Apoptose zu induzieren (33% B9; 37% B30).

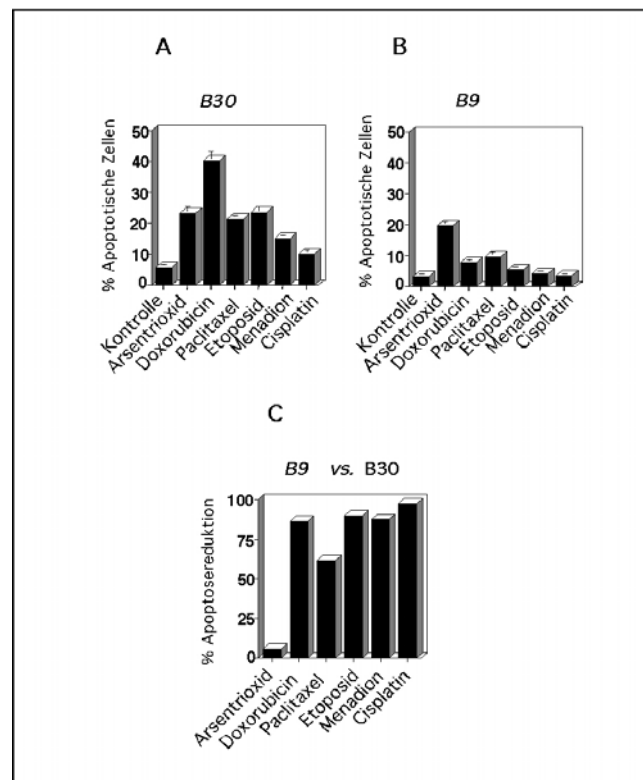


Abb. 5.1.6

CybL-defiziente Zellen sind resistent gegen bestimmte Cytostatika. (A). B30-Zellen wurden mit diversen Cytostatika behandelt und nach 18 h mittels FACS-Analyse ausgewertet. (B). B9-Zellen, CybL-defizient, wurden mit denselben Cytostatika behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Abbildung (C) zeigt den Unterschied in der Apoptoseinduktion von (A) und (B). (Die Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Herrn Frank Voß).

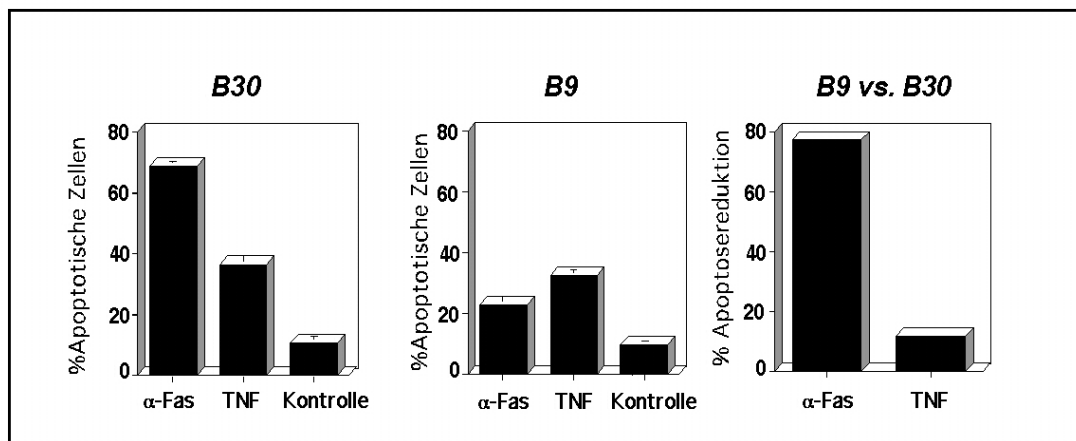


Abb. 5.1.7

Apoptoseinduktion nach Aktivierung des TNF- und Fas-Rezeptor. Apoptose in Zellen mit (B30) und ohne (B9) CybL nach Stimulierung mit TNF oder Fas. HeLa $\rho 0$ -Zellen wurden mit TNF (50 ng/ml; human) zusammen mit Interferon γ (100 U/ml) und Fas monoklonalen Antikörper (100 ng/ml) induziert. Die Apoptoserate wurde durch FACS-Analyse nach 14 stündiger Inkubation ermittelt.

5.1.4.1 Vergleich von HeLa WT- und HeLa $\rho 0$ -Zellen in Bezug auf Cytostatikainduktion bzw. auf endogene Apoptoseregulatoren

Um zu testen, wie spezifisch der unter Abschnitt 5.1.4 beschriebene Effekt ist, wurden HeLa $\rho 0$ -Zellen, in denen die gesamte Atmungskette inaktiv ist, mit denselben Cytostatika und zellulären Membranrezeptoren wie die B9/B30-Zellen induziert. Die Abbildung 5.1.8 zeigt, daß die HeLa $\rho 0$ -Zellen weniger sensitiv als die HeLa WT-Zellen sind. Mit Ausnahme von Menadion, dessen Apoptoseinduktion vollständig reduziert wurde, wurde keine höhere Repression als 42% durch die anderen Cytostatika gemessen. Etoposid hingegen induzierte in den HeLa $\rho 0$ -Zellen mehr Apoptose als in den WT-Zellen. Die Apoptoseinduktion in Bezug auf die anderen Cytostatika beläuft sich zwischen 10% für Arsentrioxid bzw. 47% für Paclitaxel. Wie im Abschnitt 5.1.4 beschrieben, wurden auch diese Zellen sowohl mit TNF als auch α -Fas behandelt. Die Induktion mit dem Fas- bzw. TNF-Antikörper zeigte eine ähnliche Reduktion (50% zu 63%; siehe Abb. 5.1.9). Um sicher zu sein, daß die Unterschiede in den HeLa WT- und HeLa $\rho 0$ -Zellen nicht auf unterschiedlich exprimierte Mengen endogener Apoptoseregulatoren zurückzuführen sind, wurden gleiche Mengen von Gesamtzellextrakten dieser beiden Zelllinien aufgetragen, und anschließend eine Immunoblotanalyse gegen Cytochrom c, Smac/DIABLO, Caspase-3 und Caspase-9, Apaf-1,

Bax, Bcl-2 und Bcl-X_L, durchgeführt. Es wurden jeweils zwei unabhängige Parallelen quantifiziert, die jedoch keinen Unterschied im endogenen Level dieser getesteten „Regulatoren“ zeigten (siehe Abb. 5.1.10).

Weil eine transiente Inhibition der Komplex II-Aktivität durch TTFA oder Überexpression von CybL mit der Apoptoseinduktion korreliert (siehe Abb. 5.1.5), wurde getestet, ob verschiedene Reagenzien, die bekannterweise auch Apoptose induzieren, ebenfalls zu einer Reduktion von Komplex II führt. Aus diesem Grund wurden HeLa WT-Zellen mit diversen Reagenzien behandelt, und die Komplex II-Aktivität noch vor Ausprägung apoptotischer Merkmale gemessen. Abb. 5.1.11 zeigt, daß alle Reagenzien zu einer verminderten Komplex II-Aktivität führten, wohingegen die Komplex I-Aktivität nahezu unverändert blieb.

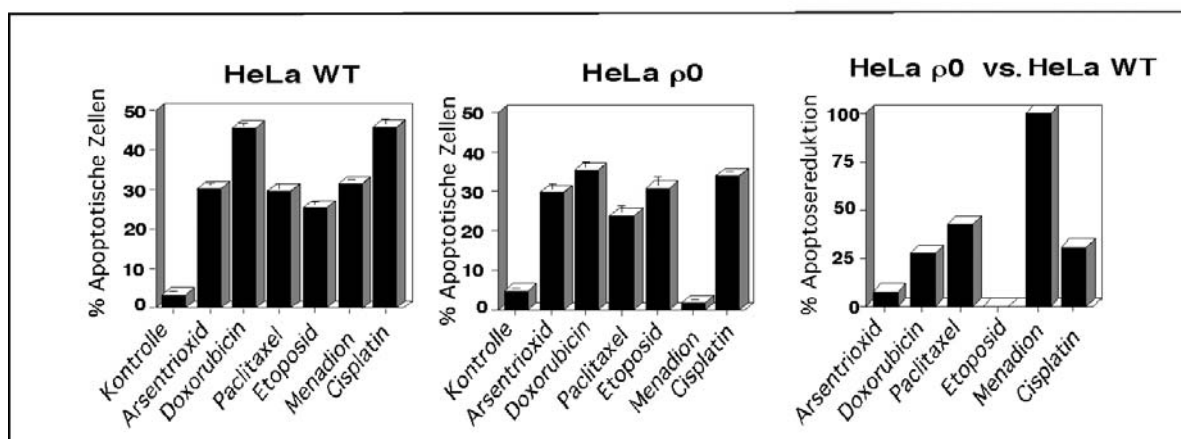


Abb. 5.1.8

Vergleich des Apoptosepotenzials von HeLa WT- und HeLa p0-Zellen. HeLa WT- und HeLa p0-Zellen wurden mit diversen Cytostatika behandelt (siehe Tab. 5.1.2) und nach 22 h mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die Abbildung zeigt die Apoptoseinduktion in der jeweiligen Zelllinie von drei unabhängigen Experimenten. Die rechte Abbildung zeigt den direkten Vergleich der Apoptosereduktion der beiden Zelllinien.

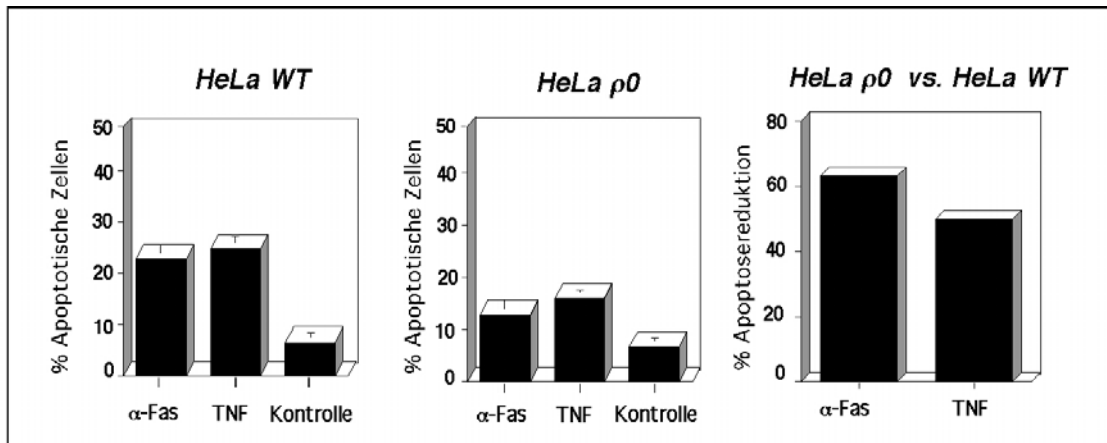


Abb. 5.1.9

Quantifizierung der Apoptoseinduktion durch den TNF- und Fas-Rezeptor. HeLa WT- und HeLa ρ0-Zellen wurden mit TNF (50 ng/ml; human) zusammen mit Interferon γ (100 U/ml) und Fas monoklonalen Antikörper (100 ng/ml) induziert. Apoptose wurde nach 14 stündiger Inkubation mit den angegebenen Antikörpern durch FACS-Analyse ermittelt.

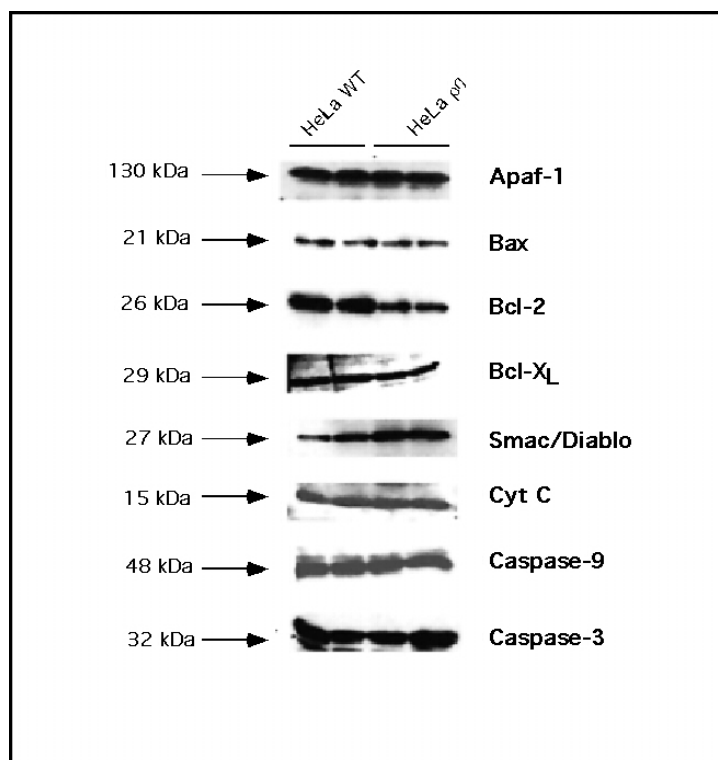


Abb. 5.1.10

Quantifizierung anti- und proapoptotischer Regulatoren in HeLa WT- und HeLa ρ0-Zellen. (A). Eine 15 cm Schale von HeLa WT- und HeLa ρ0-Zellen wurde in 100 μ l Lysepuffer auf Eis 10 min lysiert. Nach photometrischer Bestimmung des Proteingehaltes wurden jeweils 120 μ g Protein auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen, auf eine PDVF-Membran (Amersham Pharmacia, UK) geblottet und hierauf mit den entsprechenden angegebenen Antikörpern (100 μ g/ml) inkubiert.

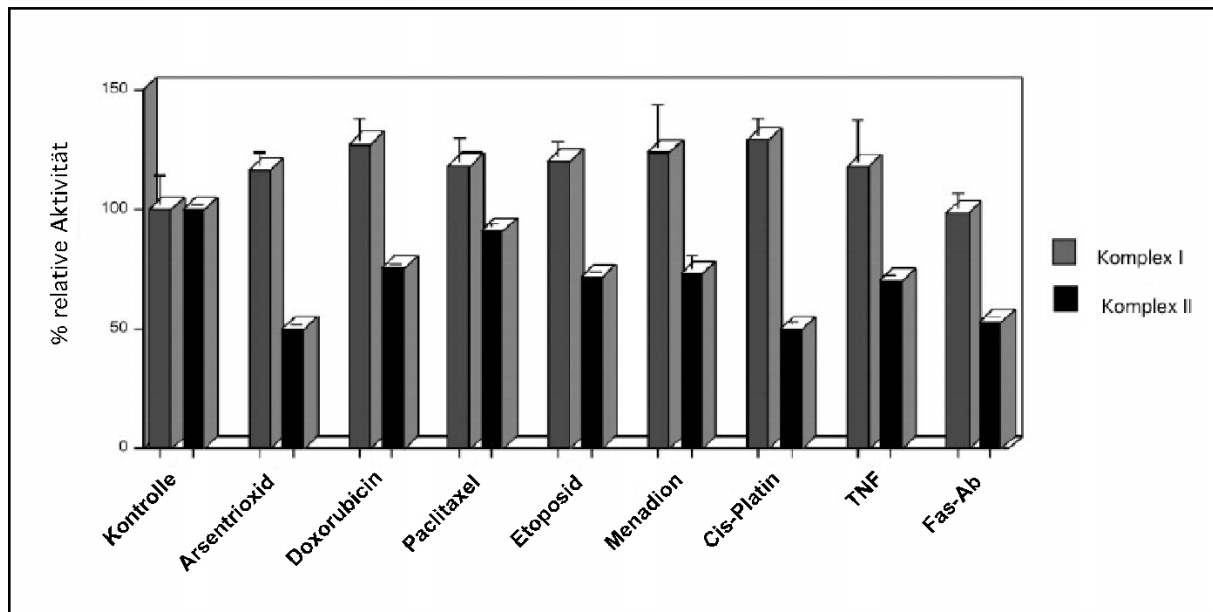


Abb. 5.1.11

Spezifische Reduktion der Komplex II-Aktivität in HeLa-Zellen nach Apoptoseinduktion. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Reagenzien behandelt, bevor Apoptosemerkmale zu erkennen waren. Die Komplex I- und Komplex II-Aktivität (Ubichinon-abhängige DCIP-Reduktion) wurde enzymatisch mittels Photometer bestimmt. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

5.1.5 Beteiligung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bei CybL-induzierter Apoptose

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) ist bei transienter Inhibition zahlreicher Komplexe der Atmungskette beteiligt. Von Ricci et al. konnte gezeigt werden, daß sowohl Komplex I als auch Komplex II an der reaktiven Sauerstoffintermediatbildung (ROI) beteiligt sind (Ricci et al. 2003) (siehe dazu auch Abschnitt 1.5.2.1). Aus diesem Grund wurde auch getestet, ob CybL, da es Bestandteil von Komplex II der Atmungskette ist, einen Beitrag zur Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten leistet. Die Abbildung 5.1.12 demonstriert, daß vor phänotypischer Ausprägung von Apoptose, CybL zur Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate führt (siehe Abb. 5.1.12; A).

Die Bestimmung erfolgte mittels FACS über Dihydroethidin (HE). Superoxidanionen sind in der Lage HE zu Ethidiumbromid zu oxidieren, das in die DNA interkaliert. Da auch TTFA Apoptose induziert (siehe Abb. 5.1.5; C), wurde untersucht, ob TTFA induzierte Apoptose auch reaktive Sauerstoffintermediate bildet. TTFA ist in der Lage, ROI zu bilden und das schon nach 6 Stunden - ein Zeitpunkt bei dem der Inhibitor noch keine Apoptose induziert (Abb. 5.1.12; B). Um herauszufinden, ob ROI notwendig sind, damit CybL bei Überexpression Apoptose induzieren kann, wurde CybL mit zwei verschiedenen Enzymen, die die Sauerstoffintermediatbildung unterbinden, in 293T-Zellen kotransfiziert. Sowohl die Cu/Zn Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase zeigten in beiden Fällen eine Reduktion der Apoptose, wobei das Enzym Katalase die Apoptose jedoch effizienter reduzieren konnte (Abb. 5.1.12; C).

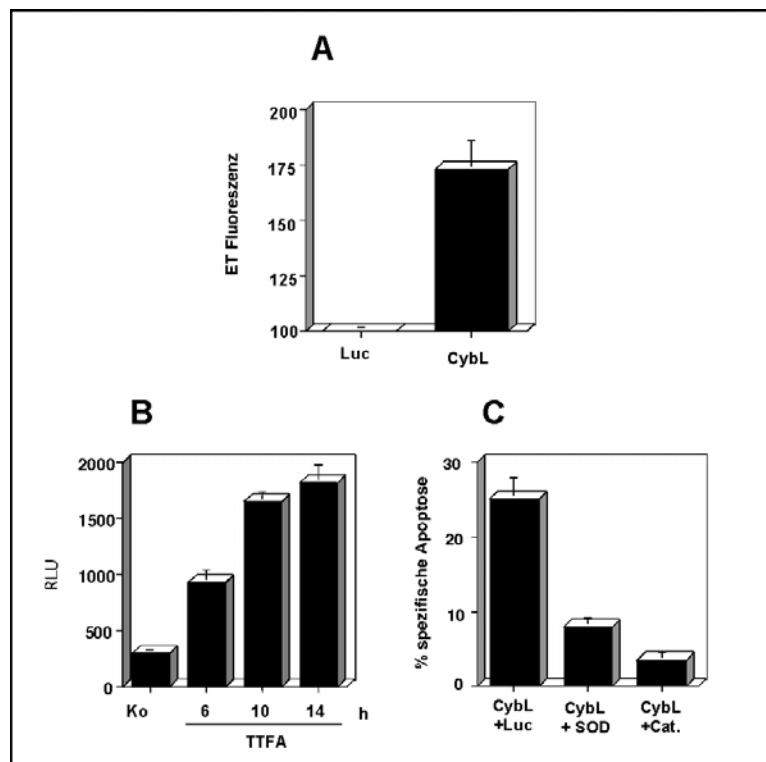


Abb. 5.1.12

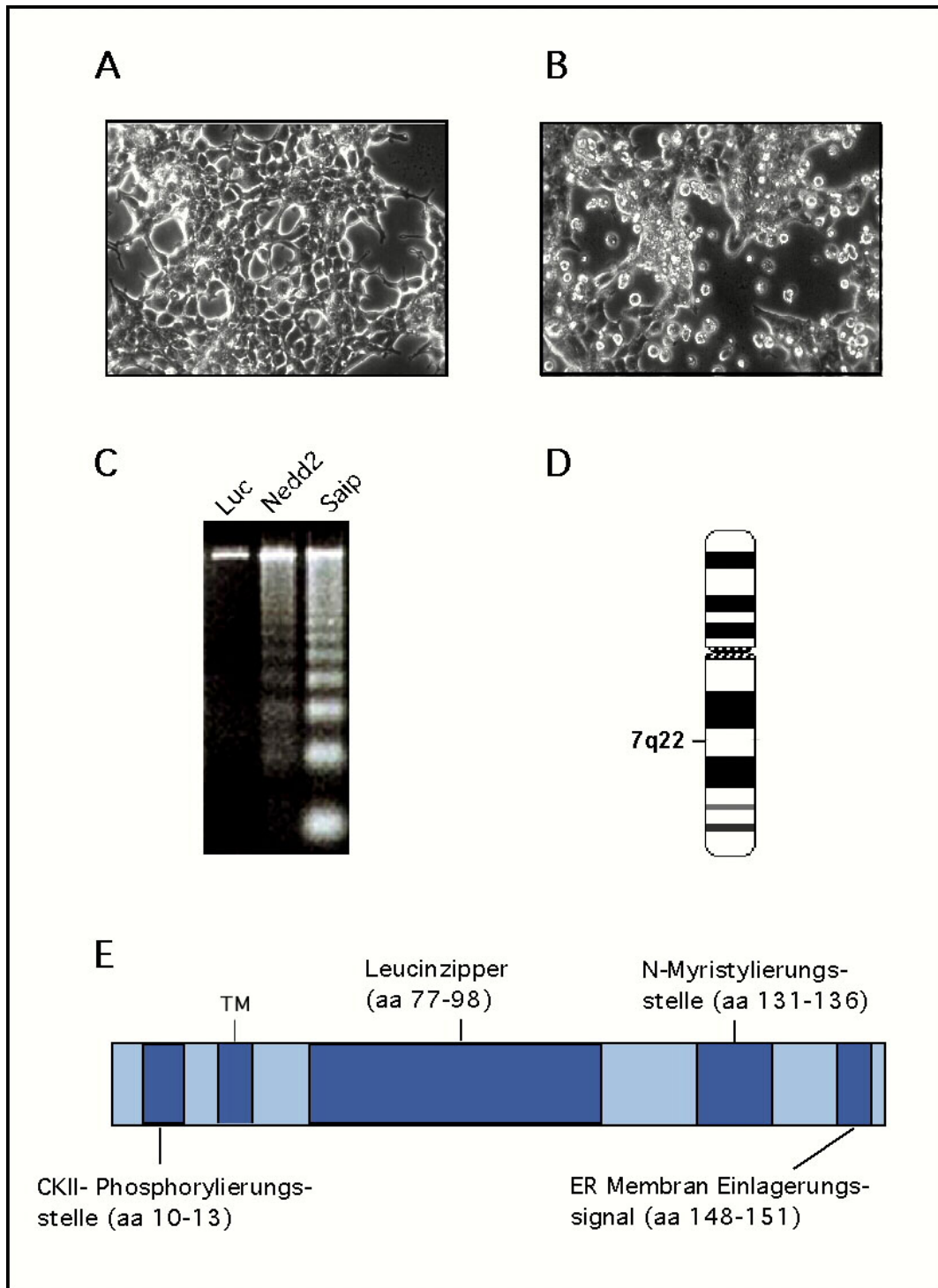
Einfluß von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) bei Überexpression von CybL. (A). Expression von CybL bildet ROI. 293T-Zellen wurden mit Luc (Kontrolle) oder CybL transfiziert. ROI-Bildung wurde nach 14 h durch HE-FACS gemessen. Dargestellt sind Zellen mit hoher Fluoreszenz (%), verglichen mit den kontrolltransfizierten Zellen. (B). Dazu wurden HeLa WT-Zellen mit den angegebenen Konzentrationen TTFA behandelt. Die Bildung der reaktiven Sauerstoffintermediate (ROI) wurde mit dem Lucigenin Assay bestimmt. (C). 293T-Zellen wurden mit CybL und Luc (Kontrolle), SOD, Katalase im Verhältnis (1:1) und pEGFP kotransfiziert. Katalase und Superoxiddismutase können CybL-induzierte Apoptose reduzieren. Die Anzahl der apoptotischen Zellen wurde durch FACS-Analyse bestimmt. Dargestellt in (A), (B) und (C) sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stefan Grimm).

5.2 Charakterisierung von Saip, eines dominant Apoptose-induzierenden Gens

5.2.1 Primäranalyse von Saip

Bei der Ausführung des „Screens“ nach dominanten, Apoptose-induzierenden Proteinen wurde ein Protein mit einer Größe von 456 bp detektiert. Dieses relativ kleine Protein wurde aufgrund seiner Größe Saip genannt (**S**mall **a**poptosis **i**nducing **p**rotein). Saip induziert durch Überexpression in Säugetierzellen Apoptose (siehe Abb. 5.2.1; A,B), und zeigt auch die für den programmierten Zelltod typische Fragmentierung der nukleären DNA (Abb. 5.2.1; C).

Das humane Homolog von Saip, in der Datenbank unter dem Synonym cgi-135 zu finden, ist im Menschen am Chromosom 7q22.1 und in der Maus am Chromosom 5 lokalisiert (Abb. 5.2.1; D). Durch Sequenzanalysen mit verschiedenen Datenbanken wurden verschiedene funktionelle Domänen detektiert. Demnach liegt zwischen den Aminosäuren 10 und 13 eine Casein-Kinase II Phosphorylierungsstelle (Pinna 1990) (Prosite Scan; (Bucher et al. 1994), zwischen den Resten 77 und 98 ein Leucin-Zipper (verantwortlich für Proteininteraktionen) vor (Landschulz et al. 1988; Lupas 1996), zwischen den Aminosäuren 131 und 136 wurde eine N-Myristylierungsstelle (wichtig für Enzym-Ligand-Interaktionen) vorhergesagt (Towler et al. 1988; Bucher et al. 1994) und ein ER-Membran-Einlagerungssignal (Lüthy et al. 1994) wurde zwischen den Aminosäuren 148 und 151 identifiziert (McNew et al. 1996). Des weiteren ist das Protein hauptsächlich (ca. 60%) aus α -Helices aufgebaut; der Rest besteht aus zufällig gefalteten Sequenzen. Ebenso beinhaltet Saip auch eine Transmembrandomäne (TMD) die im N-terminalen Bereich zu finden ist. Deletionen am N-Terminus und am C-Terminus des Proteins führen zum fast vollständigen Verlust des Potenzials zur Apoptose-Induktion. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sind für die Apoptoseinduktion von wichtiger Bedeutung (Albayrak 2001). Die Abbildung 5.2.1; (E) zeigt die grafische Übersicht der Datenbankvorhersage.

**Abb. 5.2.1**

Saip induziert bei Überexpression Apoptose. (A), (B). 293T-Zellen wurden mit Luciferase (A; Kontrolle) bzw. Saip (B) zusammen mit pEGFP kotransfiziert und unter dem Mikroskop mit 200 facher Vergrößerung nach 30 h fotografiert. (C). DNA-Fragmentierung von Saip in Säugerzellen. MCF7-Zellen wurden mit Luciferase (Kontrolle), Nedd2 (Positivkontrolle) bzw. Saip transfiziert und laut Protokoll aufgearbeitet. Die isolierte DNA wurde auf einem 1,2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, und mit dem Gelphotodokumentationssystem aufgenommen. (D). Lokalisation von Saip am Chromosom. Im Menschen ist Saip am Chromosom 7 lokalisiert. (E). Domänenbeschreibung von Saip laut Datenbankvorhersage.

5.2.1.1 Saip als genereller Apoptose-Inducer

Um auszuschließen, daß die durch Überexpression von Saip induzierte Apoptose nur auf die im *Screen* verwendeten 293T-Zellen begrenzt ist, wurden unterschiedliche Zelltypen transient mit Saip transfiziert. Eine Überexpression von Saip führt auch in HeLa- und MCF7-Zellen phänotypisch zum Zelltod (Daten nicht gezeigt). Das zeigt, daß Apoptose über einen generellen Mechanismus induziert wird. Da die MCF7-Zellen defizient an Caspase-3 (Rehm et al. 2002) sind, kann man auch den Schluß ziehen, daß Caspase-3 für Saip induzierte Apoptose nicht notwendig ist.

5.2.1.2 Saip induziert Caspase-abhängige Apoptose

Neben der phänotypischen Ausprägung der Apoptose wurde auch der biochemische Nachweis der Apoptose erbracht. Die für die Apoptose typische Fragmentierung der nukleären DNA in 180 bp Fragmente konnte schon in einer früheren Arbeit (Albayrak 2001) und auch in dieser gezeigt werden (siehe Abbildung 5.2.1; C).

Caspasen spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Apoptose. Allerdings gibt es auch Beispiele dafür, daß die für die Apoptose typischen Merkmale wie Fragmentierung der DNA, Schrumpfen der Zellen, Ausbildung von apoptotischen Körperchen etc. auch ohne Beteiligung von Caspasen vonstatten gehen kann (Xiang et al. 1996; Borner et al. 1999). Beispielsweise induzieren die TNF-Rezeptor-assoziierte Protease Cathepsin B sowie die DFF45-ähnlichen Effektoren CIDE-A und -B auch in der Gegenwart vom Pan-Caspaseinhibitor zVAD-fmk Apoptose (Inohara et al. 1998; Foghsgaard et al. 2001). Auch Mechanismen, die zur Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors AIF führen, können Caspase-unabhängig Apoptose induzieren (Susin et al. 2000; Joza et al. 2001). Um die Beteiligung von Caspasen an Saip-induzierter Apoptose zu testen, wurde Saip in 293T-Zellen, in HeLa- und in MCF7-Zellen transient transfiziert, und in Anwesenheit vom Pan-Caspaseninhibitor zVAD-fmk inkubiert. Es wurde in allen angeführten Zelllinien die Apoptoseinduktion eindeutig reprimiert, was somit auf eine caspasenvermittelte Apoptose hindeutet (siehe Abb. 5.2.2). Im Gegensatz zu 293T- und HeLa-Zellen, die mittels FACS-Analyse ausgewertet werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde die Fragmentierung in MCF7-Zellen mit dem MTT-Test nachgewiesen. MCF7-Zellen besitzen, wie schon erwähnt,

keine Caspase-3, und aus diesem Grund lässt sich die DNA-Fragmentierung mit der herkömmlichen FACS-Methode nicht messen. Der MTT-Test beruht auf der Umsetzung eines Substrates zu unlöslichem Formazan. Die Substratumsetzung geht mit einem Farbumschlag einher, der dann mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenlesers gemessen wird, und Auskunft über die Anzahl der überlebenden/toten Zellen gibt.

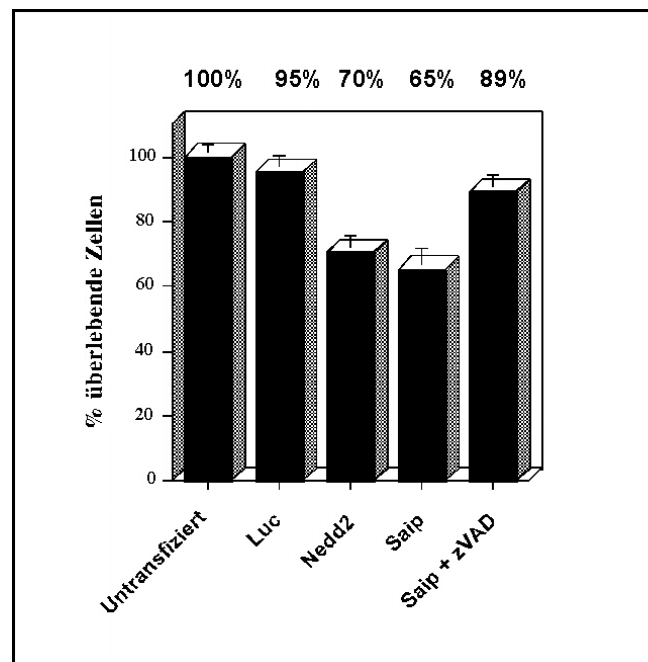


Abb. 5.2.2

Nachweis der caspasenabhängigen DNA-Fragmentierung mittels MTT-Assay. MCF7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden (4 μg Plasmid und 1 μg pEGFP) nach der Calciumphosphatmethode und anschließendem Glycerolschock transfiziert. 26 h nach Transfektion wurde der MTT-Assay laut Protokoll im 6 well-Format (in dem auch die Transfektion erfolgte) durchgeführt. Der Überstand wurde hierauf in eine 96 well-Platte überführt, und mit einem Fluoreszenzplattenleser ausgewertet. Die Werte wurden auf die Transfektionseffizienz normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

5.2.2 Homologie vom Saip-Protein in unterschiedlichen Modellorganismen

Bei einer Datenbankanalyse mit dem Programm BLAST (Altschul et al. 1994), wurden zwei Proteine aus *C.elegans* gefunden, und zwei aus *Drosophila melanogaster*, die Homologien zu Saip aufweisen. Bei *C.elegans* handelt es sich um einen sehr gut identifizierten Modellorganismus, der im Besonderen in der Apoptoseforschung eine wichtige Rolle spielt. Viele Apoptose-relevante Gene wurden zunächst in *C.elegans* beschrieben und anschließend ihre homologen Gene in Säugerzellen gefunden (Hengartner et al. 1992). Bei den Homologen von Saip handelt es sich um die beiden Proteine ce_F41G3.4 und ce_F13B9.8 (Datenbankeintrag) (Wilson 1994), die in verschiedenen Sequenzierungsprojekten identifiziert wurden. Die Aminosäuresequenzen der Proteine wurden mit dem Programm „Blast 2 sequences“ (Tatusova et al. 1999) miteinander verglichen (siehe Abbildung 5.2.3). Dabei zeigte Saip eine 39% Homologie zu beiden *C.elegans* Genen. Die beiden *C.elegans* Gene wurden jedoch bisher noch nicht mit Apoptose in Verbindung gebracht. Durch Klonierung und Überexpression beider *C.elegans* Homologe in 293T-Zellen konnte gezeigt werden, daß nur ein Klon (ce_F13B9.8) nach 36 h die für Apoptose typische phänotypische Ausprägung zeigt (Albayrak 2001). Für das Protein ce_F13B9.8 wurde zwischen den Aminosäuren 99 und 102 eine Casein-Kinase II Phosphorylierungsstelle (Pinna 1990) vorhergesagt, die bei ce_F41G3.4 zwischen den Aminosäuren 11 und 14 detektiert wurde (Prosite Scan; (Bucher et al. 1994). Des weiteren wurde für ce_F13B9.8 zwischen den Aminosäuren 121 und 126 eine N-Myristylierungsstelle gefunden, die im Protein ce_F41G3.4 zwischen den Resten 133 und 138 vorhergesagt wurde. Somit sind die Casein-Kinase II Phosphorylierungsstelle in den Proteinen Saip und ce_F41G3.4 an ähnlichen Stellen nahe des N-Terminus lokalisiert, während sie im Protein ce_F13B9.8 eher C-Terminal vorhergesagt wird. Die N-Myristylierungsstelle wurde dagegen in allen drei Proteinen an ähnlichen Positionen nahe dem C-Terminus vorhergesagt. Die bioinformatische Sequenzanalyse von ce_F41G3.4 und ce_F13B9.8 ergab jedoch keine Vorhersage eines Leuzin-Zippers oder eines ER-Membran-Einlagerungssignals, sowie einer Transmembrandomäne im Vergleich zu Saip (siehe Abbildung 5.2.1; E).

Über die beiden entfernt homologen Gene in *Drosophila melanogaster* ist bisher auch noch nicht bekannt, ob sie dominant Apoptose induzieren können, und sie wurden in der

vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die nachstehende Abbildung zeigt die Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen Spezies.

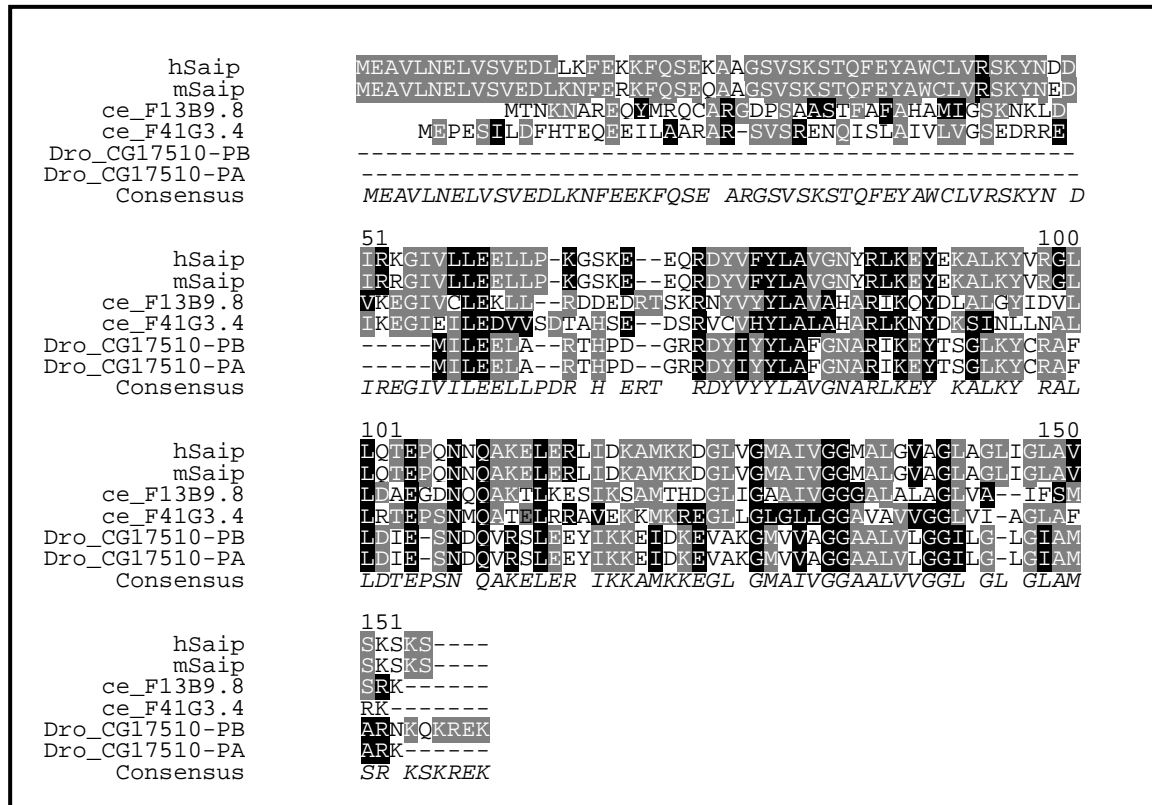


Abb. 5.2.3

Sequenzvergleich der homologen Proteine Mensch Saip (hSaip), Maus (mSaip), C.elegans (ce) und Drosophila melanogaster (Dro). Die Schwarz gekennzeichneten Aminosäuren zeigen die identischen, die grau hinterlegten teilweise identische Aminosäuren. Daraus ergibt sich die Konsensussequenz. Die Homologien betragen für identische Aminosäuren zwischen Saip und den C. elegans-Genen 39% und für ähnliche Aminosäuren 60%. Zwischen ce_F13B9.8 und ce_F41G3.4 liegen die Werte bei 33% identischer und 58% ähnlicher Aminosäuren. Damit ist Saip zu den C. elegans-Genen homologer als diese untereinander. Die Homologie von hSaip zu mSaip hingegen liegt bei 94%. Obwohl beiden Dro. melanogaster Genen ein Großteil des N-Terminus fehlt, sind sie dennoch zu Saip zu 34% homolog (Programm BLAST-Sequences)(Altschul et al. 1994).

5.2.3 Zelluläre Lokalisierung von Saip

Von Saip war bisher noch nicht bekannt, in welchen zellulären Kompartiment es lokalisiert wird. Um dies festzustellen, wurden MCF7-Zellen gewählt, da sie endogenes Saip ausreichend exprimieren und sich für Immunfluoreszenzen sehr gut eignen. Die Zellen wurden mit einem spezifischen Farbstoff für Mitochondrien (Mito-Tracker) und einem Farbstoff für das endoplasmatische Reticulum (ER-Tracker) angefärbt. Durch die jeweilige Überlagerung der ER- und Mitochondrienbilder mit dem endogenen Bild konnte dann bestimmt werden, in welchem Kompartiment Saip lokalisiert ist. Die Lokalisierung war auch für den Verlauf der weiteren Experimente entscheidend, da ein Protein, das in den Mitochondrien lokalisiert ist, anders in den Apoptosemechanismus eingreift als ein Protein, das sich am ER befindet.

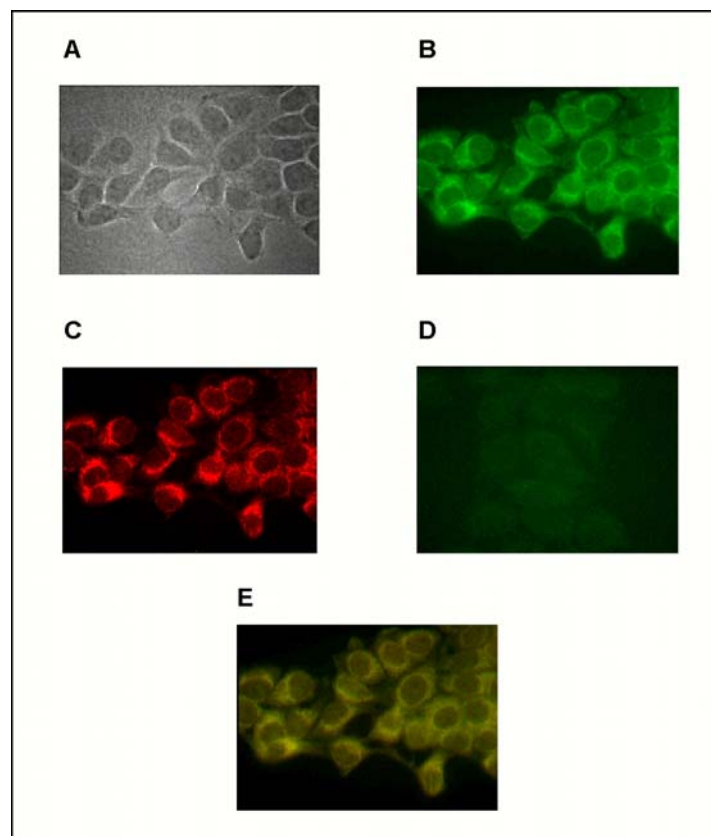


Abb. 5.2.4

Bestimmung der zellulären Lokalisation von Saip mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt sind MCF7-Zellen in der Phasenkontrastaufnahme (A), Färbung mit dem Saip-Antiserum (B), Anfärbung mit einem ER-spezifischen Farbstoff, der nachträglich am Fluoreszenzmikroskop rot eingefärbt wurde (C), der Kontrolle (D) und der Überlagerung von B und C (E). Zur Detektion von endogenem Saip

wurde ein mit AlexaGreen fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzphasenkontrastmikroskop mit entsprechender Software.

5.2.4 Expression von humanen Saip

Mittlerweile gibt es im Internet zahlreiche Programme, mit denen mögliche Transmembrandomänen, Caspaseschnittstellen und coiled-coil-Domänen für das entsprechende Gen vorhergesagt werden, und auch die Expression in den verschiedenen Geweben ist mittlerweile möglich geworden. Auch für das Homolog von Saip im Menschen (cgi-135) gibt es Vorhersagen über dessen Expression in Herz, Leber, Niere und Gehirn. Um zu testen, in welchen Geweben Saip tatsächlich exprimiert wird, wurde ein Gewebeblot (Multiple-Tissue-Blot von Clontech) verwendet, bei dem bereits abgestimmte RNA-Mengen aus verschiedenen Organen und Geweben aufgebracht sind. Da es sich bei den aufgetragenen Proben humanen Ursprungs handelt, wurde für die Hybridisierung humanes Saip radioaktiv markiert. Humanes Saip konnte in fast allen Geweben detektiert werden, mit Ausnahme der Leukozyten (Blut), in dem Saip überhaupt nicht gefunden wurde. Auffallend hohe Expression zeigten Herz, Skelettmuskel, Plazenta, Leber und Dünndarm (siehe Abb. 5.2.5). In der Niere, der ursprünglichen Zelllinie aus der Saip isoliert wurde, wird Saip sehr schwach exprimiert; jedoch konnte bei längerer Exposition des Blots ein stärkeres Signal detektiert werden (nicht gezeigt).

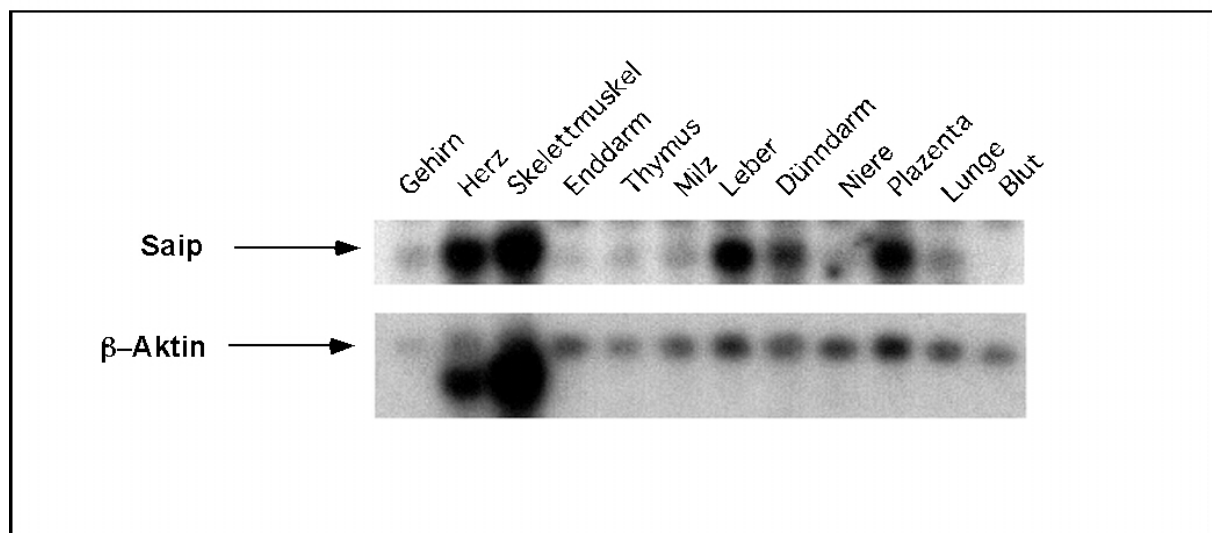


Abb. 5.2.5

Expression von humanen Saip in verschiedenen Geweben und Organen. Ein Northern-Gewebeblot von Clontech, wurde mit der humanen radioaktiv markierten Sonde von Saip über Nacht bei 65°C in einem Hybridisierungsofen unter ständiger Rotation inkubiert. Durch wiederholtes

Waschen der Membran wurde nichtgebundenes Saip entfernt. Die Auswertung erfolgte mittels Phosphorimager und dazugehöriger Software. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

5.2.4.1 Nachweis von endogenem Saip in verschiedenen Zelltypen

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserum in Kaninchen wurde murines Saip rekombinant in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe eines GST-Tags affinitätsgereinigt. Um die Spezifität des Antikörperserums zu testen, wurden 293T-Zellen mit Saip und Luciferase transfiziert, und 24 Stunden nach der Transfektion lysiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß das gewonnene Antiserum tranfiziertes, wie auch endogenes Saip, bei 15 kDa erkennt und somit der erwarteten Größe entspricht (Albayrak 2001).

Da das Saip-Antiserum äußerst spezifisch ist, wurde auch die endogene Expression von Saip in verschiedenen Zelllinien getestet. Dazu wurde mit allen im Labor zur Verfügung stehenden Zelllinien gearbeitet. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 80 μ g Gesamtprotein von jeder Zelllinie auf ein 15% SDS-PAGE aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Saip Antiserum. Erstaunlicherweise wird Saip in allen getesteten Zelllinien nahezu gleichstark exprimiert, unabhängig vom Zelltyp (siehe Abb. 5.2.6).

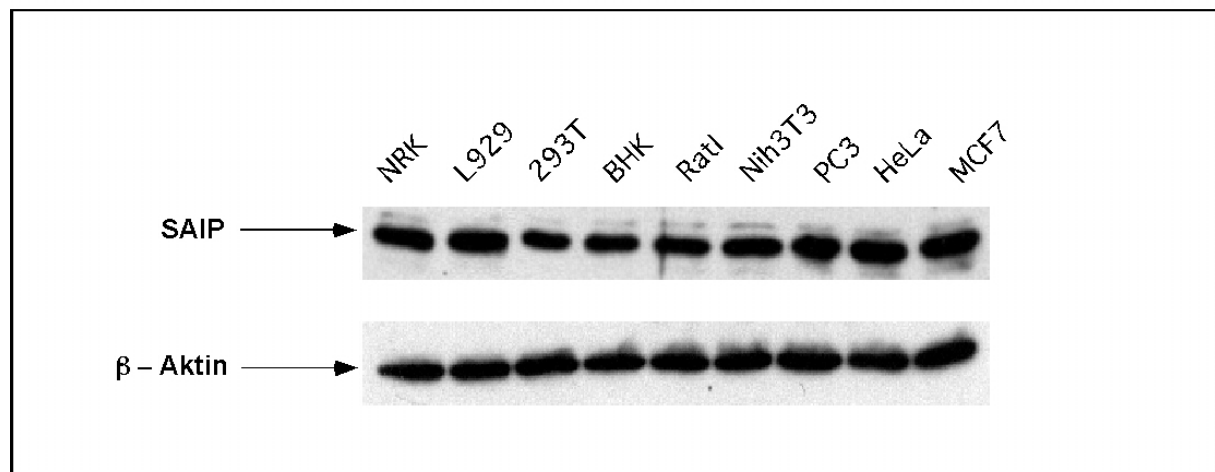


Abb. 5.2.6

Expression von Saip in ausgewählten Zelltypen. Alle angegebenen Zelltypen wurden in 10% DMEM mit Zusätzen in 15 cm Schalen kultiviert. Die Zellen wurden nachdem sie eine Konfluenz von 90% erreicht haben, abgeschabt, und in 50 μ l Lysepuffer lysiert. Nach Proteinbestimmung nach Bradford wurden 100 μ g Protein auf ein 15% SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem Antiserum gegen Saip detektiert. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin (unten).

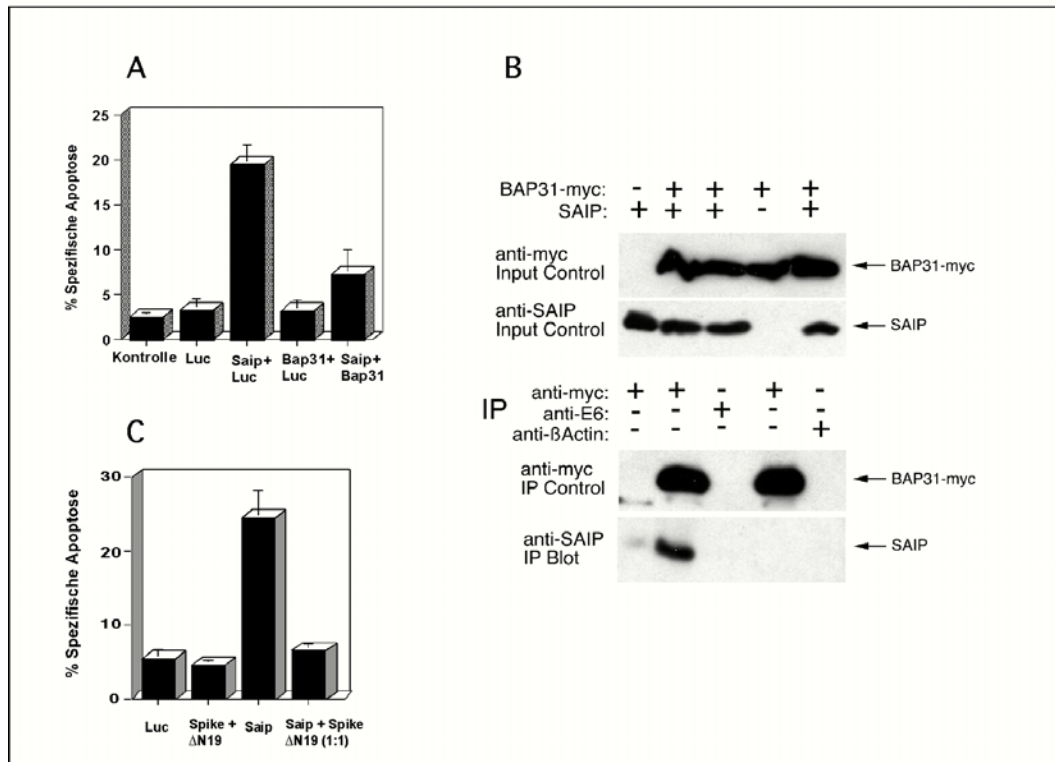
5.2.5 Saip interagiert mit Bap31 am endoplasmatischen Retikulum

Die Lokalisation von Saip am ER und die Hinweise eines Apoptose-regulatorischen Komplexes von Bap31 am ER, führten zur Annahme, daß auch Saip in die Regulation dieses Komplexes eingreift (siehe dazu auch Abschnitt 1.7.4).

Die Interaktion zwischen Saip und Bap31 wurde mittels Immunfluoreszenz in MCF7-Zellen und Coimmunpräzipitation in 293T-Zellen nachgewiesen. Dazu wurde in Bap31-myc stabilen MCF7-Zellen Saip transient transfiziert. Durch Detektion beider Signale am Fluoreszenzmikroskop konnte gezeigt werden, daß Bap31 und Saip am ER lokalisiert sind (Daten nicht gezeigt).

Durch Kotransfektion von Saip und Bap31, im Verhältnis 3:1 in 293T-Zellen, konnte ermittelt werden, daß Bap31 zu einer verringerten Apoptoseinduktion von Saip führt. Saip induziert bei Überexpression 20% spezifische Apoptose und wird bei Koexpression mit Bap31 um mehr als 50% auf 8% verringert. Diese Interaktion von Saip und Bap31 konnte auch mittels Co-IP nachgewiesen werden (Abb. 5.2.7; A,B). Vermutlich interagieren Saip und Bap31 über den Leucin-Zipper miteinander (siehe dazu auch Abschnitt 6.2.2). Dieses Experiment wurde jedoch nicht durchgeführt.

Von Mund et al. wurde erst vor kurzem gezeigt, daß Spike, ein proapoptotisches BH3-only-Protein, und dessen N-terminal verkürzte Form (Spike Δ N19), ebenfalls am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind, und mit Bap31 am ER interagieren (Mund et al. 2003). Deshalb lag die Vermutung nahe, daß auch Saip mit WT-Spike und dessen Deletionsmutante (Spike Δ N19) interagiert. Daher wurde Saip mit WT-Spike und Spike Δ N19 in 293T-Zellen überexprimiert und mittels FACS wurde die Apoptoseinduktion quantitativ bestimmt. Saip kann bereits bei gleichen Mengen (1:1) Spike Δ N19 induzierte Apoptose um mehr als 50% reduzieren. Eine funktionelle Interaktion konnte jedoch nur bei Kotransfektion mit Spike Δ N19 nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang mit Hilfe der Coimmunpräzipitation konnte sowohl mit dem WT-Spike als auch mit der N-terminalen verkürzten Form nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.2.7; C).

**Abb. 5.2.7**

Interaktion von Saip/Bap31 bzw. Saip/SpikeΔN19. (A). 293T-Zellen wurden im 6 well-Format mit Saip und Bap31 im Verhältnis (3:1) kotransfiziert. Die Auswertung der Apoptoseinduktion erfolgte nach 20 h durch FACS-Analyse. (B). Coimmunpräzipitation von Saip mit Bap31. Die angegebenen Plasmide wurden im Verhältnis (1:1) kotransfiziert und laut Protokoll mit den entsprechenden Antikörpern immunpräzipitiert. Der Nachweis erfolgte über Immunoblotanalyse. Als Negativkontrolle diente β-Aktin und der Anti-E6-Antikörper. (C). Funktionelle Interaktion von Saip mit SpikeΔN19 mittels Kontransfektion. Die jeweiligen Konstrukte wurden im Verhältnis (1:1) in 293T-Zellen überexprimiert und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Dargestellt sind in (A) und (C) die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

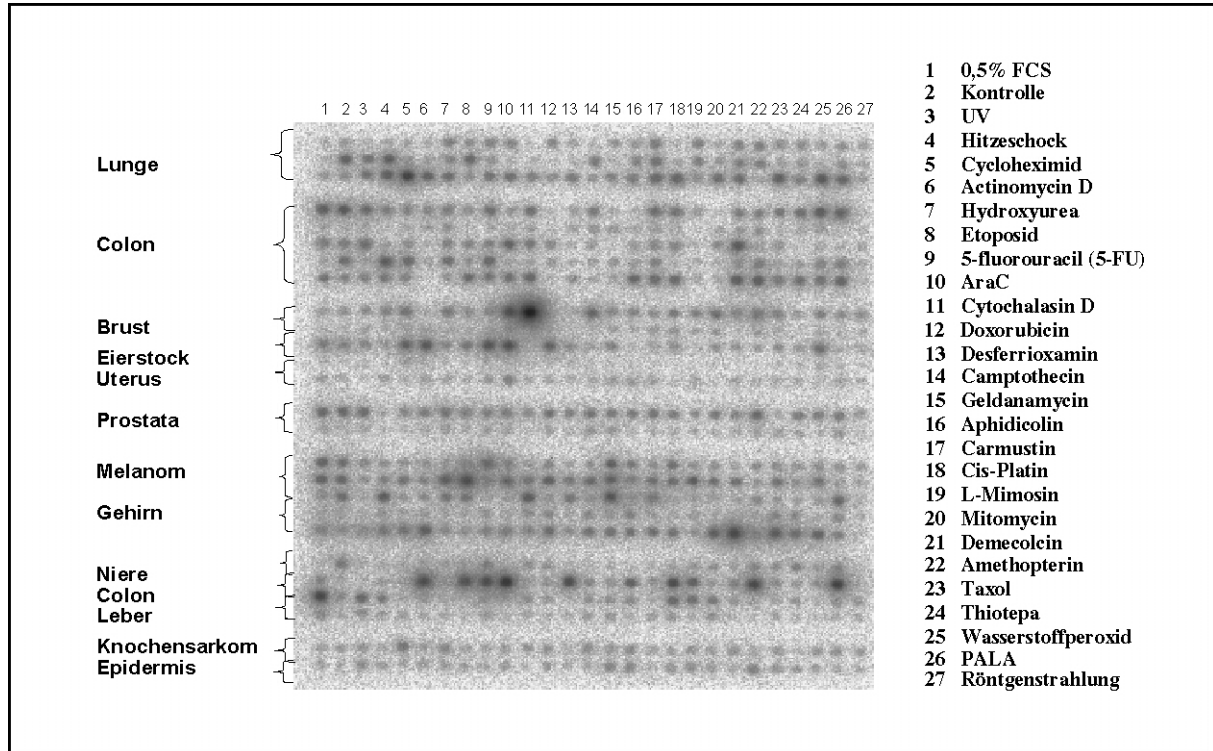
5.2.6 Hochregulation von Saip durch verschiedene Stimuli in diversen Zelllinien

Apoptose kann durch verschiedene Reagenzien ausgelöst werden. Jedoch ist das Austesten der diversen Reagenzien sehr langwierig und auch eine mögliche Regulation auf RNA-Ebene mittels Northern-Blot-Analyse ist sehr aufwendig. Aus diesem Grund gibt es von Clontech RNA-Blots, auf denen genau abgestimmte RNA-Mengen von unterschiedlich behandelten Zelllinien aufgetragen sind. Die Zellen wurden vom Hersteller mit apoptoseauslösenden Substanzen behandelt, wobei die Konzentration so bestimmt wurde, daß 48 h nach Behandlung 50% der Zellen apoptotisch waren. Die RNA wurde anschließend aufgereinigt und ein Aliquot auf eine Blotmembran aufgebracht. Nach Hybridisierung mit humanen Saip ergab sich folgendes Bild (siehe Abb. 5.2.8, Spalte 2). Hervorzuheben sind zwei Ergebnisse.

Auffallend stark wird Saip durch Cytochalasin D in MDA-MB435S Zellen (Mammakarzinomzelllinie) bis zu 80-fach hochreguliert verglichen mit der Kontrolle. In MCF7-Zellen wurde Saip durch 5FU (5-Fluorouracil) um das 4x reguliert. 5FU induziert ebenfalls Apoptose und wird in Kombination mit anderen Cytostatika in der Klinik bei Colon- und Mammakarzinomen bisher sehr erfolgreich eingesetzt (siehe Abschnitt 6.2.4). In der Abbildung 5.2.9 sind die restlichen Ergebnisse des Dot-Blots angeführt, wobei nur diejenigen Werte erfasst wurden, die mindestens eine dreifache Hochregulation gegenüber der Kontrolle zeigten.

Für die Bestätigung des Versuchs wurden die MCF7- Zellen ausgewählt, da sie im Labor zu den Standardzelllinien gehören und sich auch sehr gut transfizieren lassen. Anders als beim Clontech-Blot, bei dem die Apoptose durch MTT-Assay bestimmt wurde, wurde hier die Apoptose-Induktion durch die zwei genannten Apoptosestimuli durch Auszählen bestimmt; dabei wurde für die verwendete Substanz jene Konzentration ermittelt, bei der 50% der Zellen apoptotisch waren (selbe Bedingungen wie beim Clontech-Blot s.o.) Im Vergleich zum Northern-Blot von Clontech wurde die Hochregulation nicht auf RNA-Ebene sondern auf Proteinebene untersucht, deswegen ist ein direkter Vergleich dieser beiden Versuche nicht möglich. Auch konnte die Hochregulation von Saip durch 5FU in mehreren unabhängigen Versuchen bestätigt werden, jedoch wurde Saip durch Cytochalasin D auch bei höheren Konzentrationen (mM) nicht hochreguliert. Ein Grund dafür könnte sein, daß es verschiedene MCF7-Subzelllinien gibt, die sich sowohl morphologisch als auch in der Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, unterscheiden.

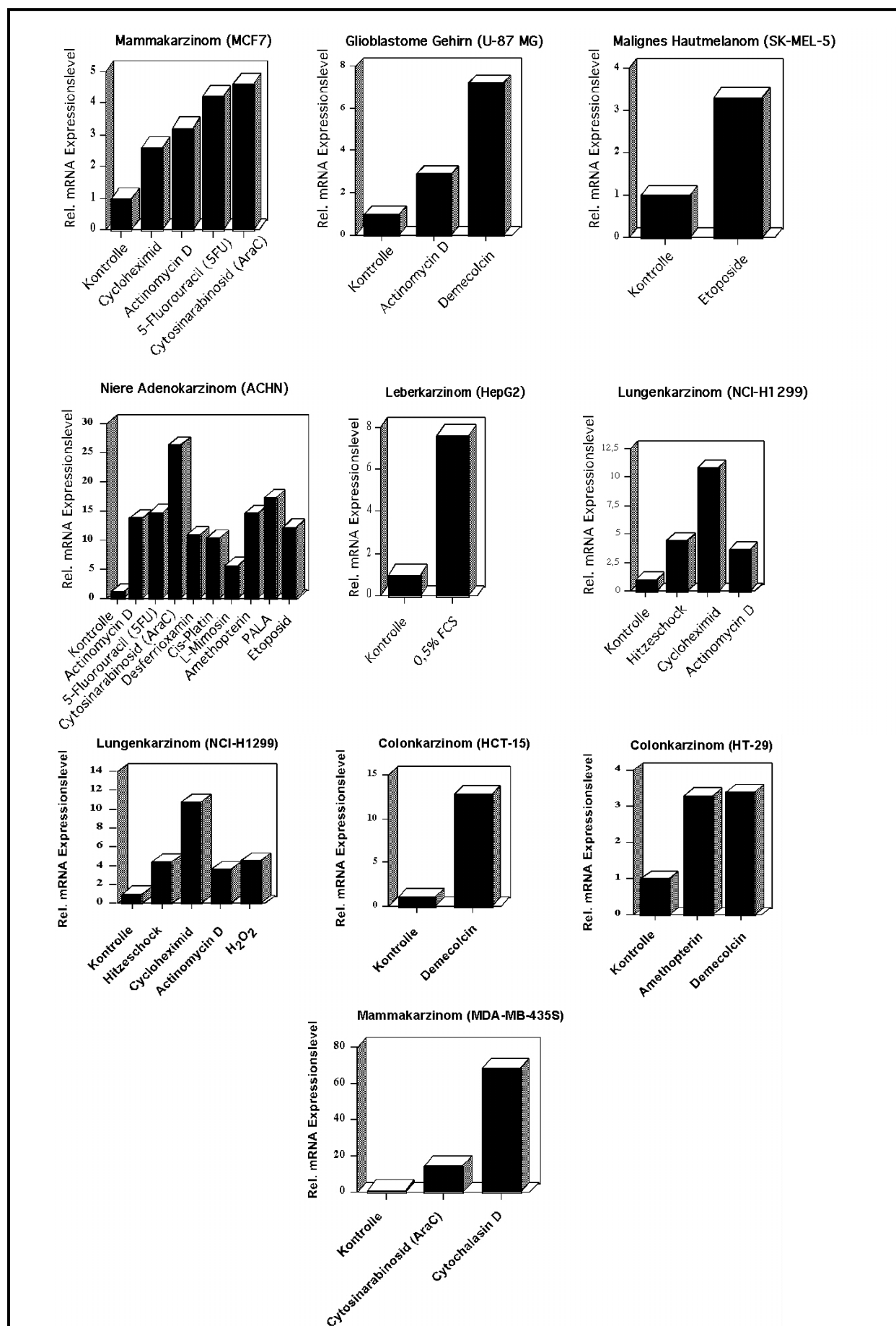
Ein weiteres auffälliges Ergebnis war die Hochregulation durch Cytochalasin D in MDA-MB-435S Zellen (s.o). Für dieses Experiment wurden genau diesselben Zellen, die auch von Clontech verwendet wurden, genommen. Diese Zellen wurden von ATCC (American Type Culture Collection) bezogen. Auch hier konnte die Hochregulation mittels Immunoblotanalyse bestätigt werden, und unterstreicht die durch Cytochalasin D hervorgerufene Hochregulation von Saip (siehe Abb. 5.2.10).

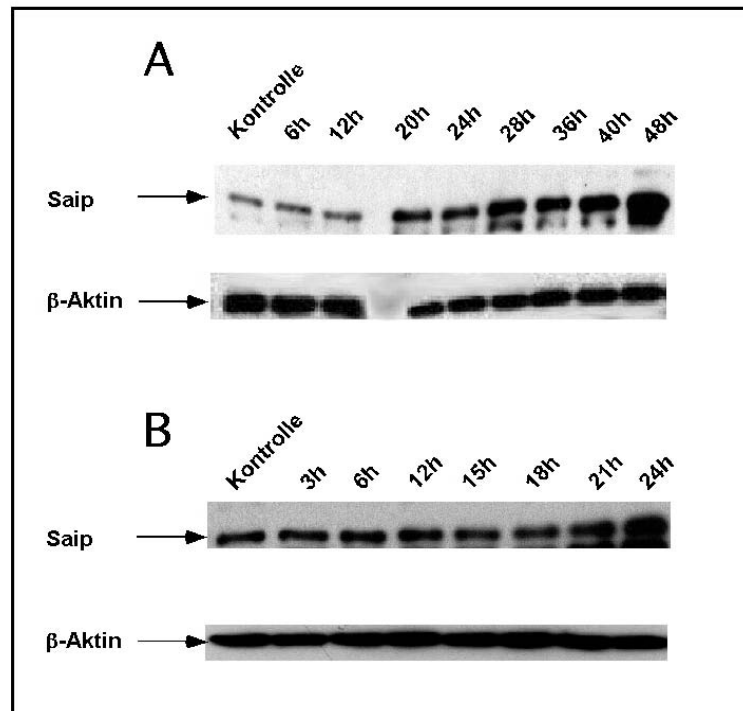
**Abb. 5.2.8**

Hochregulation von Saip. *Cancer-Cell-Line Blot* von Clontech. Der Blot wurde mit der humanen radioaktiv markierten Sonde über Nacht bei 65°C hybridisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Phosphorimagers und geeigneten Softwareprogramm. Die Intensität jedes einzelnen Punktes wurde bestimmt und mit der jeweiligen Kontrolle (Spalte 2) verglichen.

Folgende Abbildung Abb. 5.2.9

Auswertung des Blots von Clontech (siehe Abb. 5.2.9). Es wurden nur diejenigen Werte erfasst, die mindestens eine dreifache Erhöhung gegenüber der Kontrolle zeigten.



**Abb. 5.2.10**

Hochregulation von Saip auf Proteinebene. (A). Erhöhte Expression von Saip durch Cytochalasin D. MDA-MB435S Zellen wurden im 6 well-Format mit einer Konzentration von 1 μ M induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. 80 μ g Gesamtprotein wurden in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran, mittels Saip-Antikörper visualisiert. Als Kontrolle wurde β -Aktin verwendet. (B). Hochregulation von Saip in MCF7-Zellen. Experimentelle Vorgangsweise wie unter (A) beschrieben.

5.2.7 Auswirkung der Reduktion der Genexpression von Saip auf Apoptoseinduktion

Eine neue Methode, die in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Molekularbiologie für Furore gesorgt hat, ist RNAi (RNA Interference) (Paddison et al. 2002; Bosher et al. 2000; Fjose et al. 2001). Obwohl der molekulare Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, ist es trotzdem eine sehr beliebte Methode zur spezifischen Gen-Deaktivierung.

Der Nachteil von RNAi ist, daß es kein Standardprotokoll gibt, und nicht jedes Protein gleich gut inaktiviert wird. Es gibt zwei Methoden, um die Genexpression zu unterdrücken: das ist zum einen durch synthetisch hergestellte dsRNA-Oligonukleotide, die andere Methode beruht auf RNAi-Expressionsvektoren. Es wurden beide Methoden ausgetestet. Jedoch wurden in den meisten Experimenten nur mit den Vektoren gearbeitet. Die Kontrolle der

Reduktion des Proteinlevels erfolgte immer durch Western-Immunoblots gegen endogenes Saip. Die Gen-Deaktivierung ist theoretisch in jeder Zelllinie, die sich gut transfizieren lässt, möglich. Für Saip wurde die Methode in 293T-, MCF7-, HeLa- und HeLa S3-Zellen (einer Subzelllinie von HeLa-Zellen, die sich für die Oligotransfektion als sehr geeignet erwiesen haben) etabliert. Die nachstehende Abbildung zeigt ein Beispiel der Gen-Deaktivierung von Saip in HeLa S3-Zellen durch Oligos.

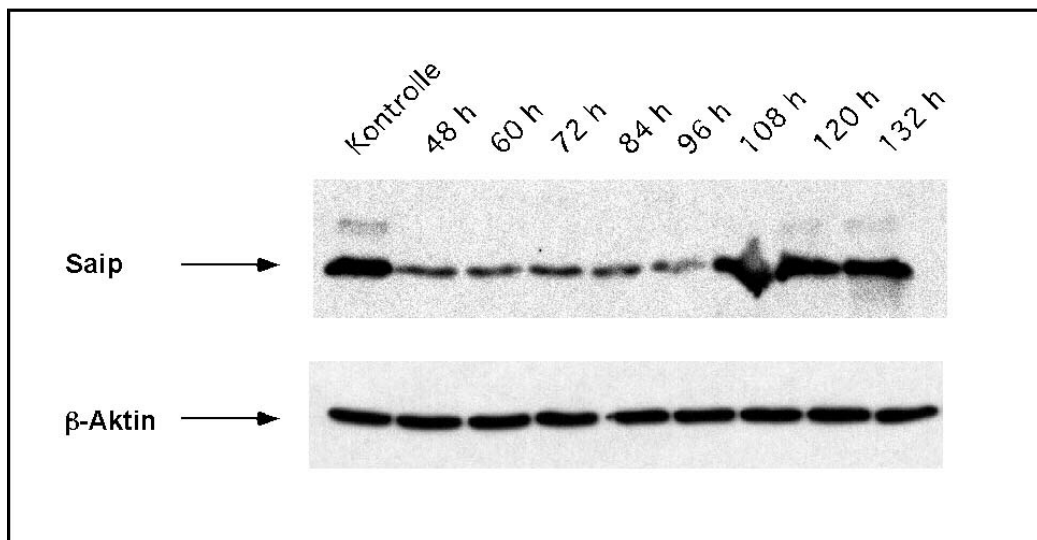


Abb. 5.2.11

RNAi gegen Saip. HeLa S3-Zellen wurden mit den gegen Saip generierten Oligos (Dharmacon, USA) mit dem Transfektionsreagenz Oligofecten transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert und auf einem 15% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Inkubation erfolgte mit dem Saip Antikörper bzw. β-Aktin Antikörper (unten) als Kontrolle.

5.2.7.1 RNAi mit Hilfe von Expressionsplasmiden

In dieser Arbeit wurden die Expressionplasmide pSHAG (Paddison et al. 2002) und pSUPER (Brummelkamp et al. 2003) verwendet.

Beide Vektoren besitzen einen Promotor für die RNA-Polymerase III. Die Polymerase produziert kleine RNAs ohne Poly-A-Schwanz, wobei die Transkriptionsstart- und Terminationssignale definiert sind. Für die Konstrukte wurden zwei komplementäre DNA-Oligonukleotide konstruiert, die genau nach Protokoll hybridisiert werden müssen. Danach wurden sie in den dephosphorylierten Vektor direkt hinter den Promotor kloniert. Für die Inaktivierung des Proteins ist eine nahezu 100%-ige Transfektionseffizienz nötig, bei schlechten Transfektionsraten konnte keine Reduktion festgestellt werden. Deswegen wurden für die Experimente nur solche Zelllinien gewählt die sich gut transfizieren lassen.

Die Abbildung 5.2.12 zeigt nur ein Beispiel der Gen-Deaktivierung in 293T-Zellen mit der dazugehörigen Ladungskontrolle. Die Methode der Deaktivierung wurde auch in HeLaS3-Zellen und in MCF7-Zellen durchgeführt und in diesen Zelllinien wurde ebenfalls die Expression von Saip unterdrückt (Daten nicht gezeigt).

Die Konstrukte pSHAG-Saip #1-#3 wurden zum gleichen Zeitpunkt transfiziert, jedoch verdeutlicht die nachstehende Abbildung (Abb. 5.2.12), daß die Transfektionseffizienz über eine erfolgreiche Deaktivierung entscheidet. Bei pSHAG #3 war die Transfektionseffizienz am besten (Daten nicht gezeigt), ersichtlich auch in der Abnahme des Signals für Saip.

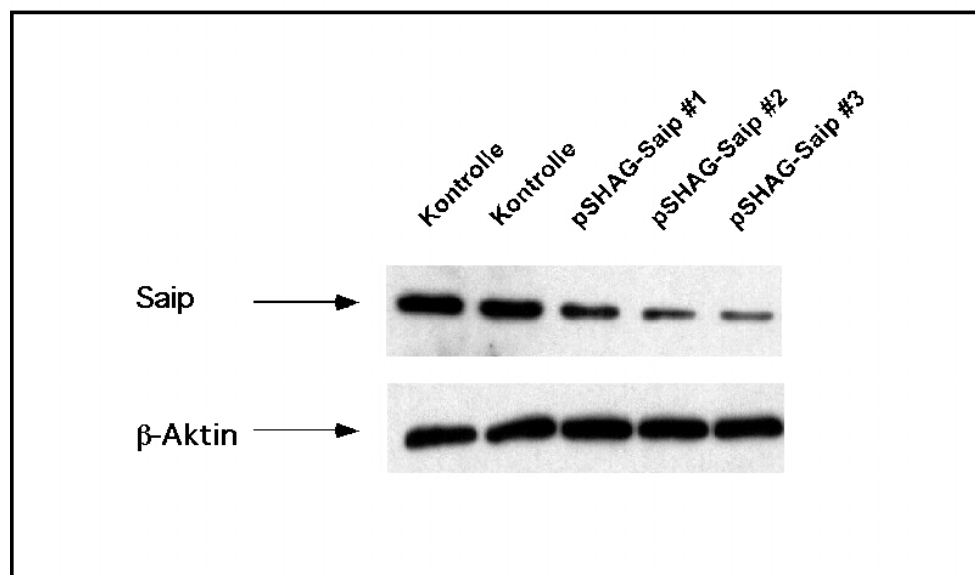


Abb. 5.2.12

RNAi mit Expressionsplasmiden führt zur Reduktion des endogenen Levels von Saip. 0,8 µg pSHAG-Saip-Vektor und 200 ng pEGFP wurden in HeLa WT-Zellen mittels Effectene transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PDVF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper gegen Saip. Als Kontrolle wurde ein pSHAG-Vektor ohne Insert transfiziert.

5.2.7.2 Die Gen-Deaktivierung von Saip führt nach Induktion mit 5FU zur Apoptosereduktion

Um zu testen, ob die Hochregulation von Saip auch funktionell von Bedeutung ist, wurde mit Hilfe von RNAi Saip deaktiviert. Die Kontrolle über die Deaktivierung erfolgte jeweils mit Western-Blot-Analyse. Die Zellen wurden mit 200 µM 5-Fluorouracil induziert und die Apoptoserate wurde mittels PI-FACS quantifiziert. Die FACS-Analyse ergab, daß sich die Apoptoseinduktion um 36% verringert, verglichen mit Zellen in denen Saip intakt ist. Das heißt, daß für die 5FU induzierte Apoptose Saip notwendig ist (Abb. 5.2.13; A)

Zur Bestätigung des Ergebnisses wurden die apoptotischen Zellen mittels FACS ohne PI-Färbung „ausgezählt“ (Abb. 5.2.13; B). Dabei wurden die Zellen mit dem Analyseprogramm „Cell-Quest“ nach ihrer Granularität aufgetrennt. Apoptotische Zellen bzw. Zellen die sich am Anfang der Apoptose befinden (Schrumpfen der Zellen), haben eine andere Lichtbrechung als nicht apoptotische, und können somit voneinander unterschieden werden. Auch mit dieser Methode konnte ein nahezu gleicher Wert der Apoptosereduktion (wie unter Abb. 5.2.13; A) ermittelt werden. Saip könnte somit einen wichtigen Beitrag zur 5FU induzierten Apoptose leisten.

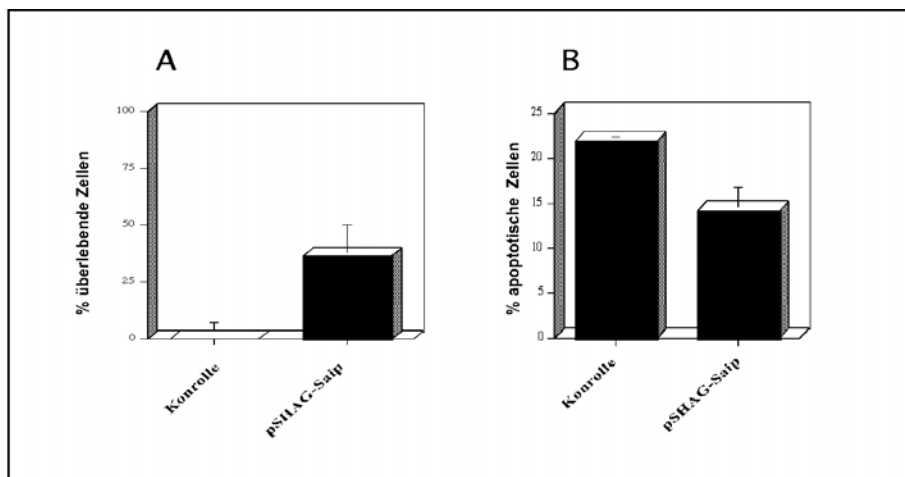


Abb. 5.2.13

Reduzierte Apoptoseinduktion durch 5FU bei Gen-Deaktivierung von Saip. (A). MCF7-Zellen wurden mit pSHAG-Saip und pEGFP kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen im 96 well-Format gesplittet und nochmals für 12 h kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit 400 μ M 5FU induziert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Auswertung erfolgte mittels MTT-Assay. (B). FACS- Analyse der Zellen aufgrund der Granularität. Zellen wurden wie unter (A) beschrieben transfiziert und induziert; anschließend wurde der Anteil der apoptotischen Zellen mittels FACS ermittelt.

6 DISKUSSION

6.1 Screening nach Apoptose induzierenden Genen

Das von Grimm und Leder entwickelte Expressions-Screeningverfahren (Grimm et al. 1997) basiert auf der Isolation einzelner Plasmid-DNA-Klone einer cDNA-Genbank im 96-*well*-Maßstab (Neudecker et al. 2000) und deren anschließender Transfektion in 293T-Zellen im 24-*well*-Maßstab. Nach 20 h bis 50 h wird das Apoptoseinduktionspotenzial der einzelnen cDNAs anhand phänotypischer Veränderungen der transfizierten Zellen mikroskopisch detektiert. Grundlage dieser Anwendung ist das Phänomen, daß nahezu jedes an der Apoptoseinduktion beteiligte Gen in der Lage ist, bei Überexpression Apoptose zu induzieren. Ursache hierfür dürften die durch Überexpression hervorgerufenen Protein-Protein-Interaktionen sein, die zur Aktivierung nachfolgender Komponenten der proapoptotischen Kaskade führen.

So wurde mit Hilfe dieses *Screens* beispielsweise das Adaptorprotein FADD des Fas- und TNF-Rezeptorkomplexes isoliert (Boldin et al. 1995; Chinnaiyan et al. 1996). Neben zahlreichen mitochondrialen Proteinen wurde unter anderem auch die Bestandteile der *permeability transition pore* (PT-Pore) ANT-1 und VDAC-2 mit diesem *Screen* identifiziert (Bauer et al. 1999) (Zoratti et al. 1994; Martinou et al. 2001a). Zusätzlich wurden weitere Apoptose-relevante Gene gefunden, die Komponenten bekannter proapoptotischer Signalkaskaden sind, wie CIDE-A, CIDE-B (Inohara et al. 1998). Beide sind Mitglieder einer Familie von Apoptose-induzierenden Proteinen, die Homologien zur N-terminalen Region des DNA-Fragmentierungsfaktors (DFF) haben und im Zellkern DNA-Fragmentierung bewirken (Inohara et al. 1998).

Es gibt eine Reihe von Genen, die durch Fehlregulation Krankheiten verursachen können. So könnte beispielsweise die Adenin-Nukleotid-Translokase-1 (ANT-1) bei Herzmuskelschwäche zu einer erhöhten Apoptoserate führen. Eine Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten, könnte ein Klon mit Homologie zu einem Presenilin-assoziierten Protein, die Kynurenin-3-monooxygenase spielen die auch bei den Krankheiten Huntington (Pearson et al. 1991), Parkinson (Pearson et al. 1992) und der HIV-Infektion (Sardar et al. 1995) involviert ist, und möglicherweise in Zusammenhang mit der jeweils dort

beobachteten Apoptoseinduktion steht. In Zusammenhang mit neuromuskulären Veränderungen bzw. Muskeldystrophien könnte dagegen z.B. die Apoptoseinduktion durch Letm1 und Synthrophin-1 relevant sein. Von ANT-1 wurde postuliert, daß es die PT-Pore durch Inaktivierung von endogenen Inhibitoren aktivieren kann (Bauer et al. 1999). Eine erhöhte Expression von ANT-1 ist vermutlich für die Herzmuskelschwäche DCM (dilated cardiomyopathy) verantwortlich, bei der eine erhöhte Apoptoserate in Herzmuskelzellen beobachtet wurde (Dorner et al. 1997) (Schultheiss et al. 1996).

Wie sich herausstellte, war das Potenzial des *Screens* für die Entdeckung neuer unbekannter apoptose-induzierender Gene, die möglicherweise an Erkrankungen beteiligt sind, sehr groß. Die zur genaueren Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten cDNAs wurden von Timur Albayrak (Albayrak 2001) aus dem *Screen* herausgezogen. Dabei handelt es sich zu einem bislang nicht genauer beschriebenes Gen, Saip (Small apoptosis inducing protein) genannt, welches in Maus und Mensch sehr stark konserviert ist.

Das zweite Gen namens CybL, ist ein als Tumorsuppressor beschriebenes Gen, und in der Literatur auch unter dem Namen QPS1 oder C_{II-3} zu finden.

6.1.2 Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)

CybL ist eine Untereinheit des Komplexes II der Atmungskette. Die Atmungskette besteht insgesamt aus vier Komplexen und der ATPase welche das notwendige ATP produziert (siehe Abbildung 6.1).

Im Jahre 1948 entdeckten Eugene Kennedy und Albert Lehninger, daß die Mitochondrien der Ort sind, an dem sich die oxidative Phosphorylierung (Energiebildungsprozeß, bei dem ATP entsteht) vollzieht. In Mitochondrien geben Protonen, die durch NAD-abhängige Dehydrogenasen von Substraten abgespalten wurden, Elektronen an die Atmungs- bzw. die Elektronentransferkette ab. Diese überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, der dadurch zu H₂O reduziert wird. Shuttle-Systeme befördern Reduktionsäquivalente von zytosolischem NADH auf mitochondriales NADH, und die Reduktionsäquivalente aller NAD-abhängigen Dehydrierungen werden an mitochondriale NADH-Dehydrogenase (Komplex I) übergeben. Hier werden sie dann über eine Reihe von FeS-Zentren zum Ubichinon übertragen, das die Elektronen an Cytochrom b übergibt, den ersten Carrier im

Komplex III. In diesem Komplex gehen die Elektronen über zwei b-Typ-Cytochrome und Cytochrom c_1 auf ein FeS-Zentrum über. Das FeS-Zentrum überträgt die Elektronen einzeln nacheinander an Cytochrom c und an den Komplex IV, die Cytochrom-Oxidase. Dieses Kupfer enthaltende Enzym, das auch die Cytochrome a und a_3 aufweist, akkumuliert dann die Elektronen und gibt sie an Sauerstoff ab, das dabei zu Wasser reduziert wird. Der Elektronenfluß durch die Komplexe I, III und IV führt zum Pumpen von Protonen durch die innere Mitochondrienmembran, wodurch die Matrix alkalischer als der Intermembranraum wird. Dieser Protonengradient liefert die Energie (bzw. die protonenmotorische Kraft) für die Synthese ATP aus ADP und P_i durch Einwirkung der innerhalb der Membran befindlichen ATP-Synthase. Die ATP-Bildung am Enzym erfordert wenig Energie, und die Rolle der protonenmotorischen Kraft besteht darin, ATP von seiner Bindungsstelle zu entfernen.

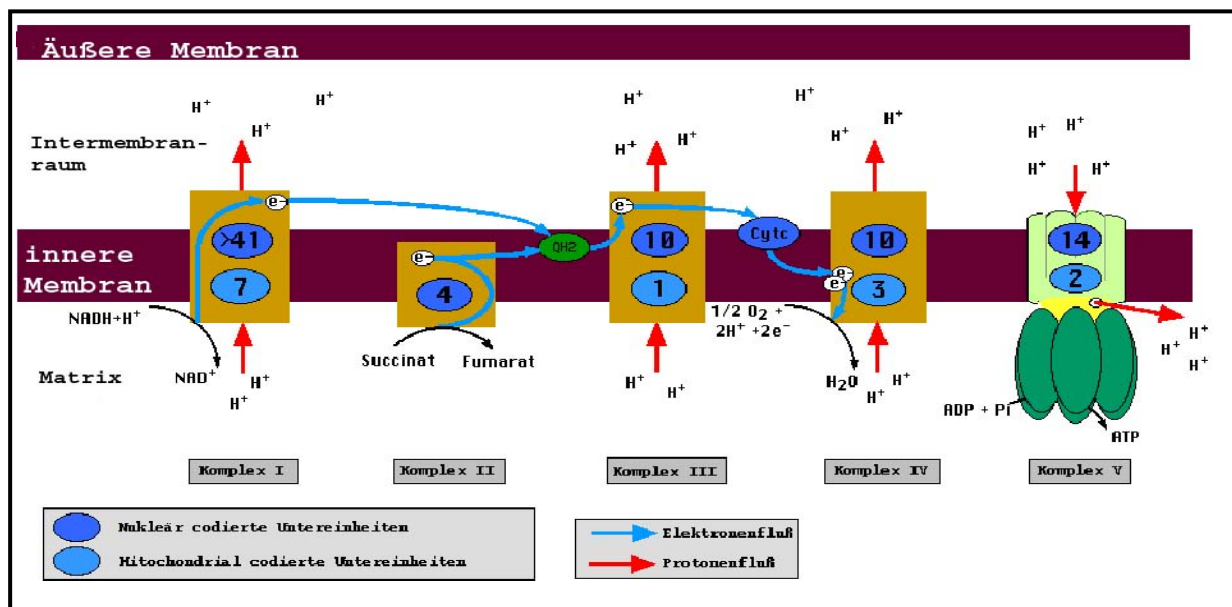


Abb. 6.1

Die oxidative Phosphorylierung. Die Elektronen von NADH und anderen oxidierbaren Substraten „durchlaufen“ eine Kette von Carriern, die in der inneren Membran asymmetrisch angeordnet sind. Der Elektronenfluß wird von einem Protonentransfer durch die Membran begleitet. Die innere Mitochondrienmembran ist für Protonen undurchlässig; diese können nur durch protonenspezifische Kanäle wieder in die Matrix gelangen. Die Protonenmotorische Kraft, die die Protonen in die Matrix zurücktreibt, liefert die Energie für die ATP-Synthese.

6.1.2.1 Pathologie der oxidativen Phosphorylierung

Defekte des mitochondrialen Energiestoffwechsels sind vielfältig in ihrem klinischen Erscheinungsbild (Poulton 1988; Hammans 1994). Ursachen können sowohl Mutationen im nukleären Genom, jedoch auch Mutationen im mitochondrialen Genom sein, die zu einem Funktionsausfall einer oder mehrerer Atmungskettenkomplexe führen, und dadurch zum Krankheitsbild beitragen. Für den Energiebedarf eines Organs kann ein Schwellenwert angenommen werden, bei dessen Unterschreiten ein Funktionsausfall eintritt. Häufig betroffen ist der neuromuskuläre Bereich, jedoch auch die audiovisuelle Wahrnehmung, innere Organe (Herz, Leber, Niere), der Gastrointestinaltrakt und das endokrine Gewebe können bei Erkrankungen wie MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers), KSS (Kearns-Sayre syndrome) Leigh-Syndrome betroffen sein (Brown et al. 1996). All diese Erkrankungen konnten bisher gut erforscht werden, und sind entweder auf eine Komplex I, II oder IV-Defizienz zurückzuführen. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson ist Komplex I beteiligt (Tatton et al. 1998; Tatton et al. 2003). So konnte bei Alzheimer eine COX-Defizienz (Cytochrom c Oxidase) im Gehirn nachgewiesen werden (Bonilla et al. 1999), die mit einer verringerten Expression der mitochondrialen DNA (mtDNA) einhergeht (Simonian et al. 1994). Erst später konnte gezeigt werden, daß auch Apoptose eine tragende Rolle in der Ausprägung der Krankheit spielt. Amyloid- β , ein Peptid, das in den Neuronen des Gehirns akkumuliert, bildet sogenannte „Plaques“ aus, und induziert direkt Apoptose. Weiters konnte die Beteiligung von Caspase-3, -8, -9 nachgewiesen werden (Vila et al. 2003). Über Komplex II ist in dieser Hinsicht noch sehr wenig bekannt. Das Leigh-Syndrom konnte jedoch einem inaktiven Komplex II zugeordnet werden (Bourgeron et al. 1995). Dabei handelt es sich um eine fortschreitende Erkrankung des Gehirns (Enzephalopathy). Die ersten Syndrome treten meistens schon in den ersten zwei Lebensjahren auf, begleitend mit Atrophy, Ataxie und Dystonie. Eine andere Mutation im Flavinprotein von Komplex II führt zur Atrophie, Ataxie und Myopathy (Birch-Machin et al. 1994).

Eine mögliche Funktion von Tumorsuppressoren ist die Induktion von Apoptose. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist das Tumorsuppressorprotein p53 (Polyak et al. 1997; Oren 1999). Mutationen in diesem Gen können zu einer eingeschränkten Aktivität desselben

führen. Da unter den Zielgenen dieses Transkriptionsfaktors auch Apoptose-induzierende Gene wie z.B. Bax gehören (Miyashita et al. 1995), kann eine Inaktivierung von p53 zu einer niedrigeren Apoptoserate führen.

CybL ist eine Untereinheit des Komplex II der Atmungskette und wurde im Jahre 2000 als Tumorsuppressorprotein beschrieben (Baysal et al. 2000). Bei der ausgelösten Erkrankung handelt es sich um Paragangliome (PGLs - manchmal auch als Chemotektoma bezeichnet), die beim Menschen vor allem im Kopf und Nackenbereich auftreten. Paragangliome sind langsam wachsende Tumore der parasympathischen Ganglien, und gewöhnlich gutartig. In den meisten Fällen wird die Veranlagung für diese Erkrankung autosomal dominant durch die betroffenen Väter übertragen. Paraganglioma sind genetisch heterogen und besitzen drei Loci. PGL1, PGL2 und PGL3. Mutationen in der chromosomalen Region, welche das CybS codierende Gen-SDHD enthält, ist in Tumoren der Brust, des Gebärmutterhalses, der Eierstöcke und in Melanomen häufig deletiert. Erst vor kurzem konnte auch eine Splicevariante im Intron-2 vom SDHD-Gen detektiert werden, die zu einem abnormen Sprung auf Exon-3 führt, und ebenfalls zur Ausbildung von Tumoren führt (Renard et al. 2003). Mutationen von CybL (SDHC-Gen) unterliegen PGL1. Es konnte gezeigt werden, daß in PGL1 betroffenen Patienten das Nukleotid Guanosin gegen Adenosin im Exon-1 der SDHC ausgetauscht ist. Eine Untersuchung führte zu der Annahme, daß PGL1 Mutationen im SDHC-Gen (Chromosom 11q23) eine partielle Inaktivierung hervorruft, sowie daß PGL1 Patienten auch einen Verlust der Heterozygotie zeigen.

6.1.3 Inhibition des Komplex II der Atmungskette durch Überexpression von CybL

Durch die Transfektion von CybL in Säugetierzellen konnte gezeigt werden, daß CybL bei Überexpression Apoptose induziert bei gleichzeitiger Inhibition von Komplex II (Albayrak 2001). Das lässt den Schluß zu, daß die Inhibition des Komplex II bei Überexpression von CybL durch die Bindung einzelner Komponenten des Komplexes zustande kommt, die dann nicht mehr für die physiologische Aktivität zur Verfügung stehen. Da es sich bei dem aus dem *Screen* identifizierten CybL um eine Splice-Isoform handelt und das zweite Exon fehlt, wurde, um diese Hypothese zu unterstützen, an den N-Terminus von CybL die mitochondriale Sequenz von Cyclophilin D kloniert (Aminosäure 1-40). Durch Überexpression in 293T-

Zellen konnte gezeigt werden, daß das Fusionsprotein und die längere Isoform von CybL annähernd gleiche stark Apoptose induzieren können - jedoch führt dieses Fusionsprotein zu einer noch stärkeren Apoptoseinduktion (siehe Abb. 5.1.1; D). Durch dieses Experiment wurde die Rolle der Mitochondrien in der Apoptose allgemein bestätigt, und es läßt die Vermutung zu, daß das durch CybL vermittelte Signal für Apoptose vermutlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dieses Ergebnis wurde auch durch Überexpression in HeLa-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Da bisher nichts über eine apoptose-induzierende Eigenschaft bei Überexpression der anderen Untereinheiten von Komplex II (FeS, FAD, CybS) bekannt war, wurden diese Untereinheiten ebenfalls in 293T-Zellen überexprimiert. Neben CybL ist nur CybS in der Lage, bei Überexpression, Apoptose zu induzieren; das Eisen-Schwefelprotein (FeS) und das Flavinprotein (FAD) induzieren keine Apoptose, und haben wahrscheinlich keinen direkten Einfluß auf die Atmungskette.

6.1.4 Apoptoseinduktion durch CybL erfolgt nur über eine intakte Atmungskette

Tumorsuppressor-Gene haben häufig die Eigenschaft, Apoptose induzieren zu können. Die apoptoseinduzierende Eigenschaft läßt vermuten, daß es sich bei Komplex II um einen Sensor für Apoptoseinduktion handelt. Darüberhinaus ist die Atmungskette als wichtiger Sensor proapoptotischer Signale bereits beschrieben worden. Bei der TNF-induzierten Apoptose wurde durch enzymatische Messung gezeigt, daß Komplex I durch Zugabe von Rotenon (Inhibitor von Komplex I) Apoptose annähernd gleich stark wie durch TNF induziert wird, begleitet vom Zusammenbruch des Membranpotenzials bzw. Freisetzung von Cytochrom c (Higuchi et al. 1998). Über den Zusammenhang von Komplex II und proapoptotischen Signalen war dagegen bislang wenig bekannt (Ricci et al. 2003). Die Ergebnisse zeigen, daß CybL sowohl bei Überexpression Apoptose induzieren kann, als auch bei Inaktivierung Komplex II inaktivieren kann.

Da Komplex II durch CybL inhibiert wird, lag die Frage nahe, ob für die Apoptoseinduktion eine intakte Atmungskette notwendig ist. Dazu wurde CybL in HeLa WT- bzw. in HeLa $\rho 0$ -Zellen transfiziert. HeLa-Zellen verfügen zwar über intakte Mitochondrien, jedoch ist die mitochondriale DNA (mtDNA) vollständig zerstört (Jiang et al. 1999). Durch die Überexpression von CybL in beiden genannten Zelllinien wurde ermittelt, daß HeLa $\rho 0$ -Zellen

ohne intakte Atmungskette nicht in der Lage sind, Apoptose auszulösen. HeLa-Zellen, in denen die Atmungskette aktiv ist, können dagegen Apoptose induzieren. Bei den HeLa $\rho 0$ -Zellen und B9-Zellen handelt es sich um unterschiedliche Zellsysteme, die verwendet wurden. Bei den HeLa $\rho 0$ -Zellen ist die Atmungskette vollständig inaktiviert, wohingegen bei den B9-Zellen nur CybL, eine Untereinheit von Komplex II inaktiv ist. Das heißt, daß die Übertragung der Elektronen auf die Atmungskettenkomplexe gestört ist, aber noch funktioniert. Die Ergebnisse mit den HeLa $\rho 0$ - und B9-Zellen, deuten darauf hin, daß für die Apoptoseinduktion von CybL eine vollständig intakte Atmungskette notwendig ist. Ist Komplex II konstitutiv inaktiv, wie in den B9-Zellen, dann kann Komplex II nicht transient inhibiert werden, und es kann keine Apoptose ausgelöst werden.

Erstaunlicherweise benötigen viele der eingesetzten Cytostatika (siehe Tab. 6.1) eine intakten Komplex II um Apoptose induzieren zu können. Es konnten jedoch auch Reagenzien gefunden werden, wie zum Beispiel Arsentrioxid, bei der die Komplex II-Aktivität unverändert bleibt. In HeLa $\rho 0$ -Zellen jedoch führt die Behandlung mit Arsentrioxid und anschließender Komplex II-Messung zu einer Verringerung in dessen Aktivität. Das könnte ein Hinweis dafür sein, daß die Reduktion der Apoptose von Komplex II zellspezifisch ist. Die Ergebnisse könnten daher für die therapeutische Behandlung von Tumoren von Bedeutung sein, in denen Komplex II inaktiviert ist. Da therapeutische Reagenzien, wie zum Beispiel Etoposid, auch über endogene Membranrezeptoren Apoptose vermitteln können, wurde getestet, ob TNF und Fas, zwei Membranrezeptoren, auch Apoptose induzieren können. Die beobachtete Apoptoseinduktion, die nach Stimulierung mit TNF und Fas, in Komplex II-defizienten und Komplex II-rekonstituierten Zellen beobachtet wurde, läßt die Vermutung zu, daß TNF in diesen Zellen Komplex II für die Apoptoseinduktion nicht benötigt. Im Gegensatz dazu, könnte die Reduktion der Fas-vermittelten Apoptose einen Beitrag in der Tumorgenese von Komplex II-defizienten Zellen beitragen. Dazu gibt es Untersuchungen die zeigen, daß der Fas-Rezeptor oder dessen Ligand in vielen Tumoren mutiert sind, und wahrscheinlich als Tumorsuppressoren fungieren (Muschen et al. 2000).

Cytostatikum	HeLa WT/HeLa $\rho 0$	B9/B30
Doxorubicin	20 μM	4 μM
Paclitaxel (Taxol)	40 μM	4 μM
Menadion	40 μM	40 μM
Etoposide	400 μM	4 μM
Cis-Platin	500 μM	400 nM
Arsentrioxoid	10 μM	30 μM

Tab. 6.1 Konzentration der eingesetzten Cytostatika

Zelltod korreliert mit einer transienten Inhibition von Komplex II durch TTFA bzw. durch CybL. So könnte eine CybL-Überexpression dazu führen, daß der Elektronenfluß von Komplex I auf Komplex II gestört ist, es zur Ausbildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten kommt, und dadurch Apoptose induziert wird. So wird zum Beispiel auch Komplex I, der Atmungskette, durch TNF (Higuchi et al. 1998) bzw. Komplex II durch Ceramid-vermittelte Apoptose (Gudz et al. 1997) inhibiert. Wenn jedoch Komplex II inaktiv ist, wie in den B9-Zellen, dann kann der Komplex II nicht transient inaktiviert werden, und es kann in weiterer Folge auch keine Apoptose induziert werden. Daher ist auch die Resistenzfähigkeit von den B9-Zellen gegenüber Cytostatikabehandlung zu erklären.

Wenn einige proapoptotische Stimuli andere Komplexe der Atmungskette benützen, was könnte der Vorteil sein, das viele der getesteten Cytostatika Komplex II benötigen ?

Ein Grund könnte darin liegen, das die Elektronen Komplex II gar nicht benötigen, sondern, daß die Elektronen bei der Übertragung von Komplex I auf Komplex III den Komplex II nur „passieren“. Da dadurch der Elektronenfluß nicht massiv gestört wird, bleibt die gesamte Atmungskette intakt, und es kann ATP produziert werden. Wenn jedoch alle Komplexe der Atmungskette inhibiert werden, dann werden auch keine Elektronen mehr übertragen, und es kommt zum völligen Zusammenbruch der Atmungskette. Es kann dann kein ATP, das für die Zellen lebensnotwendig ist, mehr produziert werden, und die Zelle stirbt nekrotisch. Andererseits könnten in Tumorzellen, in denen Komplex II inaktiv ist, noch genügend ATP produzieren. In HeLa $\rho 0$ -Zellen, die über intakte Mitochondrien, aber über keine mitochondriale DNA verfügen, wird trotzdem Apoptose induziert.

6.1.4.1 CybL inhibiert nur Komplex II

Um zu testen, wie spezifisch CybL Komplex II inhibiert, wurde auch der Komplex I und die Succinatdehydrogenaseaktivität (SDH) gemessen. Die Succinatdehydrogenase ist das einzige membrangebundene Enzym im Citratzyklus. Der in den Mitochondrien ablaufende Citratzyklus (Citronensäurezyklus) ist einer der wichtigsten Stoffwechselwege der eukaryotischen Zelle überhaupt und nimmt eine zentrale Stellung im Rahmen der aeroben Dissimilation ein. Das Citrat wird in mehreren Schritten abgebaut, bis am Ende wieder Oxalacetat vorliegt. Während dieser vielen Abbauschritte wird NADH/H^+ gewonnen. Die meisten Abbauschritte sind Oxidationsreaktionen, die Wasserstoff freisetzen, der dann vom NAD^+ aufgenommen wird.

Obwohl kleiner und einfacher gebaut als Komplex I, enthält Komplex II zwei Arten von prosthetischen Gruppen und 4 verschiedene Proteine. Ein Protein besitzt ein kovalent gebundenes FAD und ein FeS-Zentrum. Elektronen fließen vom Succinat zum FAD und dann über die FeS-Zentren zum Ubichinon. CybL-Überexpression führt zu einer Verminderung der Komplex II-Aktivität, wohingegen die Aktivität der Succinatdehydrogenase unverändert blieb. Man kann daraus schließen, daß das Eisen-Schwefel-Protein und das Flavinprotein, die die SDH-Aktivität bewerkstelligen, strukturell aktiv bleiben und CybL den Elektronenfluß auf das Ubichinon unterbindet. Eine ähnliche Situation wurde auch in *C.elegans* beschrieben, indem es auch ein Bcl-2-Homolog (*ced-9*) gibt (Ishii et al. 1995; Senoo-Matsuda et al. 2001). Von Matsuda und Mitarbeitern wurde gezeigt, daß die Mutante (*mev-1*) in Cyt-1 (große Untereinheit von Cytochrom b in Komplex II) eine Punktmutation beinhaltet. Bei Überexpression führt diese Mutation einerseits zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) und andererseits zu einem abnormen Energiemetabolismus, ähnlich wie bei CybL. Im Unterschied zu Cyt-1 liegt bei CybL jedoch keine Punktmutation vor.

6.1.5 Die Rolle von Komplex II bei der Sauerstoffradikalbildung

Reaktive Sauerstoffintermediate (Reactive oxygen intermediates-ROI) werden von allen eukaryotischen Zellen während der mitochondrialen Zellatmung gebildet (Boveris et al. 1973).

Im Verlauf der Aktivierung von Mitochondrien kommt es zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma (z.B. Cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO, Omi/Htra2 und Endo G), wo diese ihre Wirkung entfalten. Diese Freisetzung erfolgt entweder direkt über Kanäle, oder indirekt durch die Bax- oder Bak-induzierte Öffnung der PT-Pore, die beide mitochondrialen Membranen durchzieht. Infolge der PT-Porenöffnung kommt es zu einem Ionenstrom zwischen Zytoplasma und Matrix und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials. Über mehrere Zwischenschritte werden Caspasen aktiviert, die die Apoptose einleiten. Es konnte gezeigt werden, daß in Abwesenheit von Caspasen das Membranpotenzial über Stunden, sogar über Tage nahezu unverändert bleibt (Waterhouse et al. 2001). Die Beobachtung führte zur Vermutung, daß Caspasen die mitochondriale Funktion innerhalb weniger Minuten nach Cytochrom c Freisetzung beeinflussen. Caspase-3 führt zur Zerstörung der Sauerstoffübertragung durch Komplex I und Komplex II-Substrate der Atmungskette. Substrate die durch den Elektronentransfer auf Komplex IV übertragen werden, sind daran nicht beteiligt. Die Komplex III-Aktivität, gemessen durch die Cytochrome c-Reduktion, bleibt jedoch nach Transfektion von Caspase-3 intakt. In apoptotischen Zellen, in denen der Elektronentransport und die Sauerstoffversorgung von Komplex I oder II abhängig ist, wurden ebenfalls caspasenabhängig zerstört. Die Daten zeigen, daß nach Zusammenbruch des Membranpotenzials und Freisetzung von Cytochrom c, das zur Aktivierung von Caspasen führt, die mitochondriale Funktion geschädigt wird (Verlust des $\Delta\psi_m$), und Sauerstoffradikale in Komplex I und II der Atmungskette aufgrund von Caspasen gebildet werden (Ricci et al. 2003).

Aus diesem Grund wurde getestet, ob CybL, da es Bestandteil von Komplex II ist, auch an der Sauerstoffradikalbildung beteiligt ist. Der Nachweis der Superoxidanion-Bildung beruht auf der Oxidation von Hydroethidin zu Ethidiumbromid, welches in die zelluläre DNA

interkaliert und durchflusszytometrisch erfasst werden kann (Hu et al. 2000). Es wurde gezeigt, daß Überexpression von CybL ebenfalls zur ROI-Bildung führt (siehe Abb. 5.1.12).

Um herauszufinden, ob die Bildung von ROI notwendig ist, damit CybL Apoptose induzieren kann, wurde CybL mit zwei verschiedenen Enzymen kotransfiziert. Die Cu/Zn-Dismutase (SOD) und die Katalase. Beide Enzyme führten zu einer Erniedrigung in der Apoptose; die Katalase zeigte jedoch den stärkeren Effekt, ein Hinweis dafür, daß reaktive Sauerstoffmediate an CybL induzierter Apoptose beteiligt sind.

Es ist wichtig zu erwähnen, daß CybL polycistronisch mit *ced-9* homolog von Bcl-2 in *C.elegans* ist (Hengartner 1994), und die vorliegende Arbeit dürfte auch dazu beitragen, die Verbindung zwischen diesen beiden Genen zu verstehen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die Apoptoseinduktion durch CybL-Überexpression mit einer transienten Inhibition von Komplex II und Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) einhergeht. Hervorzuheben ist, daß Zellen, die defizient an CybL sind, gegenüber zahlreichen proapoptotischen Reagenzien und dem Fas-Rezeptor resistent sind. Aufgrund der Daten darf vermutet werden, daß Komplex II ein Sensor für Apoptoseinduktion ist, und könnte auch erklären, daß Komplex II in Tumoren inaktiviert ist.

6.2 Saip als Teil eines Apoptose-Sensors des Endoplasmatischen Retikulums

Ein weiteres Gen, welches durch den Screen als Apoptose-induzierend identifiziert werden konnte, wurde Saip (**S**mall **a**poptosis **i**nducing **p**rotein) genannt. Es handelt sich dabei um ein Gen, welches ein 152 Aminosäuren langes Protein kodiert, dessen Lokalisation durch Immunfluoreszenz im Endoplasmatischen Retikulum bestimmt wurde (siehe Abschnitt 5.2.5). Nicht alle für die intrinsische Apoptose-Induktion wichtigen Stimuli sind in den Mitochondrien lokalisiert. Es existieren Stimuli, die das apoptotische Programm ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum aktivieren. Ein solcher Stimulus ist ER Stress (Welihinda et al. 1999). Mit Saip wurde ein neues proapoptotisches Protein gefunden, das ausgehend vom ER in der Lage ist, Apoptose zu induzieren.

In Vertebraten wie auch im Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) und in der Taufliege *Drosophila melanogaster* ist Saip evolutiv erstaunlich stark konserviert. So ist das *C.elegans*-Homolog und das *D.melanogaster*-Homolog zu 42% bzw. 34% mit dem Maus-Saip identisch. Die humane Sequenz von Saip ist verglichen mit der Maussequenz sogar zu 98% identisch und unterscheidet sich nur in wenigen Positionen (siehe Abb. 5.2.3); deswegen konnten viele Experimente mit dem Mausklon durchgeführt werden und lassen sich wahrscheinlich, aufgrund der großen Homologie, auch auf das humane System übertragen.

Das Apoptose-induzierende Gen aus *C.elegans* verfügt allerdings nur über eine Casein-Kinase II-Phosphorylierungsstelle und eine N-Myristylierungsstelle, aber kein ER-Einlagerungssignal. Es ist anzunehmen, daß für das proapoptotische Signal, welches durch Saip vermittelt wird, kein ER-Einlagerungssignal essentiell ist, andernfalls sollte dieses auch in dem homologen, Apoptose-induzierenden *C.elegans*-Gen erwartet werden. Die Casein-Kinase II-Phosphorylierungsstelle liegt in dem Apoptose-induzierenden *C.elegans*-Gen zwischen den Aminosäuren 99 und 102 und ist damit, relativ zur Lage der Phosphorylierungsstelle in Saip, weiter C-terminal gelegen. Die Casein-Kinase II aktiviert durch Phosphorylierung eine große Zahl Proteine, darunter auch Transkriptionsfaktoren. Die Inhibition dieser Phosphorylierung z.B. durch die niedermolekulare, organische Substanz Neocarzinostatin führt zur Induktion von Apoptose (Ohtsuki et al. 1981). Es ist jedoch noch unklar, ob Saip durch Casein-Kinase II phosphoryliert wird. Aus Versuchen mit verschiedenen Deletionsmutanten von Saip geht hervor, daß sowohl der N-Terminus als auch

der C-Terminus für das Potenzial, Apoptose zu induzieren, notwendig sind (Albayrak 2001). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß durch die Deletionen des Proteins die dreidimensionale Struktur dermaßen beeinflusst wird, daß entsprechende Interaktionspartner nicht mehr gebunden werden können.

6.2.1 Saip induziert Caspase-abhängige Apoptose

Wie viele andere proapoptotische Faktoren (wie z.B. Bax) besitzt auch Saip die dominante Eigenschaft, bei Überexpression Apoptose in Säugetierzellen zu induzieren. So führt die Überexpression von Saip bei transienter Transfektion zu den für die Apoptose typischen Merkmalen in den transfizierten Zellen. Es kommt zu phänotypischen Veränderungen, wie die Bildung apoptotischer Körperchen (*membrane blebbing*), DNA-Fragmentierung, Caspase-Aktivierung, Cytochrom c-Austritt und zu einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotenzials. Dabei wird eine Kaskade von Caspasen aktiviert, die in den meisten Fällen für die charakteristischen, biochemischen und morphologischen Merkmale der Apoptose verantwortlich ist. Saip induziert in 293T-Zellen Apoptose und auch in MCF7-Zellen, denen jedoch nachweislich die Effektor-Caspase-3 fehlt. In beiden Zelllinien können Merkmale wie z.B. DNA-Fragmentierung mit dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk vollständig unterbunden werden; ein Hinweis für die Beteiligung von Caspasen an Saip-induzierter Apoptose.

6.2.1.1 Saip als genereller Apoptoseregulator

Saip wird laut Datenbankvorhersage in sehr vielen Geweben exprimiert, und dürfte daher in vielen Fällen als Apoptoseregulator wirken.

Die Datenbankanalysen sind jedoch nur Vorhersagen, deswegen wurde die genaue Expression von Saip mittels Northern-Blotanalyse und Immunoblotanalyse gegen Saip in verschiedenen Geweben und Zelltypen getestet. Im Northern-Blotverfahren zeigt sich, daß Saip nahezu in allen getesteten Geweben vorkommt. Saip wird am stärksten im Herzen, Skelettmuskel, Dünndarm, Leber und Plazenta exprimiert. Auffallend ist jedoch auch, daß Saip in der Niere, der ursprünglichen Zelllinie aus der Saip isoliert wurde, schwach exprimiert wird. Bei längerer

Exposition des Northern-Blots, kann jedoch auch dort ein Expressionssignal detektiert werden.

Aus der Immunoblotanalyse gegen Saip bei verschiedenen Zelltypen ergab sich in jedem getesteten Zelltyp eine prominente Bande, was wiederum ein Hinweis ist, daß Saip ein ubiquitäres Protein ist. Selbst in Mauszellen, humane Zellen, Hamsterzellen etc. ist kein Unterschied zu erkennen - die Expression ist überall annähernd gleich stark. Saip wird auch sehr stark in NRK-Zellen exprimiert. NRK-Zellen sind Nierenzellen. In der Northern-Blotanalyse konnte nur eine geringe Expression von Saip nachgewiesen werden. Das breite Expressionsspektrum in den meisten getesteten Geweben und aufgrund der EST-Daten läßt die Vermutung zu, daß Saip wahrscheinlich in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien einen wichtigen Beitrag zur Apoptose leistet (siehe Abschnitt 1.3). Da Saip in den Geweben und Entwicklungsstadien bereits detektierbar ist, findet eine Regulation der Saip-Aktivität vermutlich auf posttranslationeller Ebene über Modifikationen statt. Eine transkriptionelle Induktion in spezifischen Geweben bzw. auf verschiedene Stimuli konnte eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.2.6).

6.2.2 Saip interagiert am endoplasmatischen Retikulum mit Bap31 und Spike Δ N19

Im Endoplasmatischen Retikulum ist ein Proteinkomplex lokalisiert, in dem Bcl-X_L, Procaspase-8 (bzw. Procaspase-8L), Bcl-2 und Bap31 vorliegen. Bei Bap31 handelt es sich um ein 28 kDa großes Transmembranprotein, welches über zwei Caspaseschnittstellen an der Aminosäureposition 167 und 240 aa verfügt, die vorzugsweise durch Caspase-8 und -1, gespalten werden (Ng et al. 1997). Zwischen den beiden Schnittstellen befindet sich ein Leucin-Zipper, der - wie bei Saip - auf der zytosolischen Seite des Proteins lokalisiert ist. Das Protein verfügt über drei Transmembrandomänen (TM), die in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums eingelagert sind. Nach der Spaltung von Bap31 durch Initiator-Caspasen entsteht ein 20 kDa großes Fragment, welches dominant Apoptose induzieren kann. Wenn die beiden Caspase-Schnittstellen derart modifiziert werden, daß sie nicht geschnitten werden können, bleiben verschiedene zytosolische Ereignisse der Apoptose nach Induktion mit dem Fas-Liganden aus. Nguyen und Kollegen haben gezeigt, daß Zellen, die eine Deletionsmutante von Bap31 stabil exprimieren, bei Fas-Behandlung nicht mehr das

typische Muster der DNA-Fragmentierung zeigen, und auch phänotypisch zeigten die Bap31-Deletionsmutanten keine Veränderung (Nguyen et al. 2000). Darüberhinaus wurde nachgewiesen, daß Bap31 mit *ced-4* aus *C.elegans* interagieren kann. Dabei handelt es sich um ein Adaptormolekül, welches die Rekrutierung und Aktivierung der *C.elegans* Procaspase *ced-3* erlaubt.

Bcl-X_L bindet ebenfalls indirekt und kooperativ an die zytosolische Domäne von Bap31, abhängig von der Anwesenheit von *ced-4*. Dies lässt darauf schließen, daß ein *ced-4* ähnliches Adaptorprotein in Säugerzellen existiert, welches für die stabile Assoziierung von Bcl-X_L und Bap31 in vivo zuständig ist. Dieses hypothetische Adaptorprotein konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Florence et al. 1998). Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen Apaf-1 und *ced-4* erscheint es allerdings wahrscheinlich, daß es sich bei dem gesuchten Adaptorprotein um Apaf-1 handelt.

Damit eine Zelle effizient auf die unterschiedlichsten Apoptosesignale reagieren kann, existieren Procaspasen-enthaltende Proteinkomplexe an strategisch wichtigen subzellulären Strukturen. Neben dem DISC an der Plasmamembran (Kischkel et al. 1995) und dem zytosolischen Apoptosom zur Vermittlung mitochondrialer Zelltodsignale (Zou et al. 1997), gewinnt der Bap31-Komplex immer mehr an Bedeutung (Ng et al. 1997; Breckenridge et al. 2003). Immunfluoreszenzdaten in MCF7-Zellen verdeutlichen, daß endogenes Saip eindeutig mit einem ER-spezifischen Marker kolokalisiert. Bei Überlagerung beider ER-Tracker gefärbten Fluoreszenzbilder, von Saip und Bap31, konnte eine komplette Übereinstimmung detektiert werden (siehe dazu Abschnitt 5.2.3). Diese funktionelle Interaktion wurde auch durch Kotransfektion mit Bap31 und durch Coimmunpräzipitation nachgewiesen. Die Koexpression von Saip und Bap31 lieferte den Hinweis, daß Saip und Bap31 auf Proteinebene interagieren. Die Coimmunpräzipitation unterstützt diese These. Bei 3-fachen Überschuß von Saip gegenüber Bap31 zeigte sich, daß Saip induzierte Apoptose reduziert werden kann. Das in dieser Arbeit identifizierte Protein Saip verfügt – wie auch Bap31 – über einen Leucin-Zipper. Bei diesen Strukturen handelt es sich um Proteininteraktionsdomänen. Der Leucin-Zipper zeichnet sich dadurch aus, daß jede achte Aminosäure des Polypeptides aus der Aminosäure Leucin besteht. Durch diese Anordnung kommt es vorwiegend zur Ausbildung von α -Helices, die mit hoher Affinität Dimere bilden können. Diese Bildung der Dimere erfolgt parallel, und bildet somit eine sogenannte „coiled coil“-Domäne. Wie jedoch die Leucin-Zipper zweier unterschiedlicher Proteine miteinander interagieren, ist bis heute noch unklar. So kann auch über den Mechanismus zwischen Saip und Bap31, die beide einen

Leucin-Zipper enthalten, nur eine Vermutung angestellt werden. Möglicherweise verbinden sich die Leucin-Seitenketten über hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Gruppen der zweiten Helix in der Überspirale (Landschulz et al. 1988). Wie gezeigt wurde, ist Bap31 in der Lage, Saip induzierte Apoptose zu inhibieren. Möglicherweise wechselwirken die beiden Proteine über den Leucin-Zipper an der zytosolischen Seite miteinander und Bap31 hemmt dadurch die proapoptotische Funktion von Saip. Wenn Apoptose induziert wird, ist Bap31 eines der Zielproteine für die proteolytische Aktivität von Caspasen. Durch die Desintegration des Proteins würde die inhibitorische Wirkung aufgehoben und Saip könnte seine proapoptotische Aktivität entfalten. Durch diese Aktivierung würden im weiteren Falle auch noch andere Caspasen aktiviert werden, die Saip in seiner proapoptotischen Eigenschaft hervorheben. Die nachstehende Abbildung zeigt eine Möglichkeit der Interaktion zwischen Saip und Bap31 mit dem Leucin-Zipper an der zytosolischen Seite.

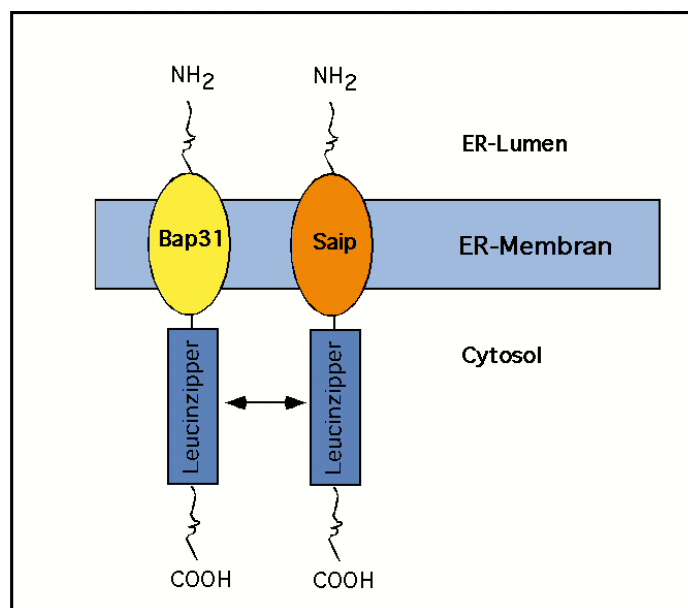


Abb. 6.2.1

Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkung von Saip mit Bap31. *Bap31 und Saip sind Proteine, die fest im ER verankert sind und mit dem C-terminalen Ende (inklusive Leucin-Zipper) in das Zytosol reichen. Die Wechselwirkung dieser beiden Proteine läuft vermutlich über diese Leucin-Zipper ab. Wie die Wechselwirkung genau vonstatten geht, ist allerdings noch unbekannt (Landschulz et al. 1988).*

Bei Spike (Small protein with inherent killing effect) handelt es sich um ein proapoptotisches 31 kDa BH3-only-Protein das ebenfalls am ER lokalisiert ist, und ebenso wie Saip mit Bap31 interagiert. Die Interaktion von Spike mit Bap31 wird jedoch durch Kotransfektion mit Bcl-X_L aufgehoben. Bei der Deletionsmutante von Spike, die ebenfalls mit Bap31 interagiert, sind

die ersten 15 aa am N-Terminus deletiert (Spike Δ N19). Da sowohl Spike als auch Saip an Bap31 binden können, lag die Vermutung nahe, daß auch Saip sowohl mit dem WT-Spike als auch mit der N-terminalen verkürzten Form interagiert. Die funktionelle Interaktion von Saip mit Spike Δ N19 konnte jedoch nur in Kotransfektionsexperimenten nachgewiesen werden. Die physikalische Interaktion mittels Co-Immunpräzipitation mit der Deletionsmutante führten zu keinem positiven Ergebnis. Experimente mit dem WT-Spike zeigten sowohl physikalisch als auch funktionell keine Interaktion mit Saip.

6.2.3 Hochregulation von Saip durch diverse Stimuli

Mittels Northern-Blot-Analyse konnte eine weitere Funktion von Saip ermittelt werden. Da Saip ein ubiquitäres Protein ist, und in sehr vielen Geweben und Organen nachgewiesen werden kann (siehe Abschnitt 5.2.4), wurde die Hochregulation von Saip durch Behandlung mit verschiedenen Substanzen, die bekanntermaßen Apoptose induzieren, getestet. Dazu wurde ein Northern-Dot-Blot von der Firma Clontech bezogen. Auf diesem Blot sind RNAs unterschiedlich behandelter Zellen aufgetragen. Nach Hybridisierung mit der humanen Saip-Sonde, konnte ermittelt werden, daß Saip im speziellen in Mammakarzinom-Zelllinien (MCF7 bzw. MDA-MB-435S) sehr stark hochreguliert wird (siehe Abb. 5.2.8). Daß der Blot spezifisch ist, zeigt auch das andere Gene (z.B. CD82 oder RAIP), die aus dem Screen herausgezogen worden und von Mitarbeitern bearbeitet worden sind, so eine massive Hochregulation nicht zeigen (Daten nicht gezeigt). Der Mechanismus der Hochregulation bei Saip ist noch völlig unklar, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß Saip neben der transkriptionellen Regulation auch translationell reguliert wird. Promotorstudien, die vielleicht einen Aufschluß über den molekularen Mechanismus von Saip geben könnten, wurden nicht durchgeführt. Besonders die Hochregulation von 5-Fluorouracil (5FU) könnte von Bedeutung sein, da sich in der Klinik in Kombination mit anderen Reagenzien bereits beachtliche Erfolge in der Bekämpfung von Magen- und Mammakarzinomen erzielen lassen (siehe Abschnitt 6.2.4).

6.2.4 RNAi, eine Methode zur Gen-Deaktivierung von Saip

Um die biologische Funktion eines Gens im Organismus feststellen zu können, bedurfte es bislang komplizierter und zeitaufwendiger "Knockout"-Versuche, in denen das spezifische Gen in seiner Funktion unterdrückt wird.

In den letzten 2 Jahren hat jedoch eine Methode für Furore gesorgt, die es erlaubt, auf schnellere Art und Weise das gewünschte Gen auszuschalten. Die Entdeckung und Weiterentwicklung der RNAi-Methode (RNA-Interference) stellt einen großen Vorteil in der Molekularbiologie dar, in dem mittels RNAi, Funktionen und Zuordnung eines unbekannten Proteins schneller entschlüsselt werden können.

RNAi ist ein posttranskriptioneller Prozeß, bei dem durch Transfektion das Einbringen von doppelsträngiger DNA (dsRNA) in Zellen zu einer Degradation der mRNA führt. Diese Methode wurde zuerst in *C.elegans* entdeckt (Kelly et al. 1998), später auch in anderen Modellorganismen wie *Drosophila*, und zuletzt wurde die Methode auch in humanen Zelllinien verwendet. Auch Pilze und Pflanzen besitzen diese Eigenschaft der posttranskriptionellen Kontrolle (Hannon 2002). Auch im Menschen wird RNAi sicherlich einen großen Beitrag leisten, um Krankheiten zu bekämpfen z.B. gegen virale Pathogene, krankheitsauslösende Gene, Modifizierung von primären Zellen außerhalb des Körpers um unerwünschte Genprodukte zu entfernen. Aufgrund der Spezifität eignen sich dsRNAs sehr gut als therapeutische Moleküle, jedoch ist es bisher sehr schwierig sie auch wirkungsvoll einzusetzen.

Die Hauptfunktion der RNAi-Methode ist der Schutz sowohl vor parasitären und fremden Nukleinsäuren, wie sie zum Beispiel bei der viralen Infektion auftreten können, als auch der Schutz vor der Ausbreitung endogener Transposons und Retroposons (Banerjee et al. 2002).

Mittels der RNAi-Methode konnte auch eine weitere Funktion von Saip, neben der Interaktion mit Bap31, entschlüsselt werden. Es wurde herausgefunden, daß bei Deaktivierung des Proteins Saip und anschließender Induktion mit der Substanz 5FU (5Fluorouracil) die Apoptose um bis zu 36% reduziert wird. Saip könnte somit eine therapeutische Relevanz in der Behandlung von Colon- und Brustkarzinomen zukommen, da 5FU bei den genannten Tumoren in der Klinik bereits erfolgreich zum Einsatz kommt. Antimetabolische Reagenzien wirken, in dem sie wichtige molekulare Prozesse inhibieren, oder in die DNA oder RNA eingebaut werden, und damit die normale Funktion hemmen.

Fluoropyrimidine wurden in den 50-iger Jahren entwickelt und wurden erstmals in Ratten eingesetzt. 5FU wird heutzutage bei verschiedenen Krebsarten angewendet, hauptsächlich bei Brustkrebs und Colorektalkarzinomen. Obwohl 5FU in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zu einer Verbesserung in der Bekämpfung von Brustkrebs führt, zeigt es bei Colorektalkarzinomen den größten Erfolg. Alleine beläuft sich der Wirkungsgrad auf ca. 10-15%. In Kombination mit Oxaliplatin oder Irinotecan (Chemotherapeutika) lässt sich die Erfolgsquote auf 50% steigern (Giacchetti et al. 2000).

5FU ist ein Analog von Uracil mit einem Fluorin Atom anstatt von Wasserstoff an der C5-Position. Es dringt genau wie Uracil sehr schnell in die Zelle ein (Wohlhueter et al. 1980). 5FU kann mehrere Mechanismen aktivieren. Einbau von Fluorouridintriphosphat (FUTP) in die RNA, Einbau von FdUTP in die DNA und Inhibition der Thymidylatsynthase durch Fluorodeoxyuridinmonophosphat (FdUMP), das dann zur DNA-Schädigung führt. Innerhalb der Zelle wird es dann in verschiedene aktive Metaboliten umgewandelt: Fluorodeoxyuridinmonophosphat (FdUMP), Fluorodeoxyuridintriphosphat (FdUTP) und Fluorouridintriphosphat (FUTP). Diese aktiven Metaboliten inhibieren die RNA-Synthese und die Thymidylatsynthase (TS) und das limitierende Enzym im Katabolismus, die Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPD) die für die DNA Replikation und Reparatur benötigt wird (siehe Abb. 6.2.2).

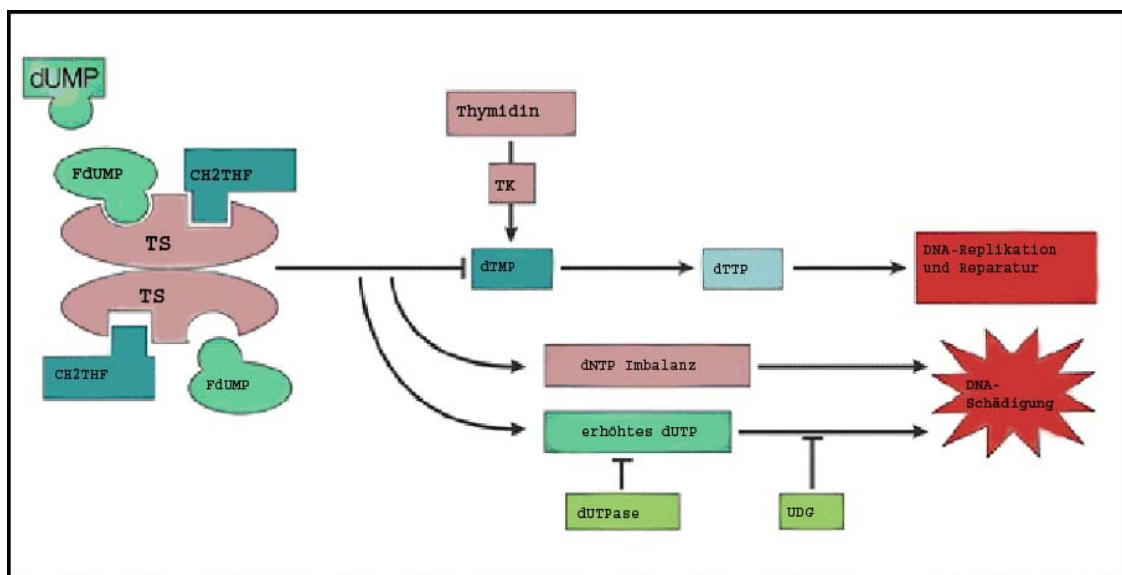


Abb. 6.2.2

Mechanismus der Thymidylatsynthase Inhibition durch 5-Fluorouracil (5FU). Der 5FU aktive Metabolit Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) bindet an die Nukleotidbindungsstelle der Thymidylatsynthase (TS) und bildet einen stabilen Komplex mit TS und CH₂THF und blockiert in weiterer Folge die Synthese von dTMP. Dadurch wird verstärkt Desoxyuridintriphosphat (dUTP) gebildet, das wiederum zur Schädigung der DNA führt. Der Grad der Schädigung hängt von der Menge an gebildeter Pyrophosphatase und Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) ab (Longley et al. 2003).

Mit Saip, einem am ER lokalisierten Protein, welches mit Bap31 und einer dominant negativen Deletionsmutante von Spike (Spike Δ N19) interagiert, wurde ein neues Gen mit Hilfe des Screens identifiziert. Dadurch wird auch die Relevanz des Screeningverfahrens apoptoseinduzierende Proteine zu detektieren, die möglicherweise an Erkrankungen beteiligt sind, hervorgehoben. Obwohl der Mechanismus wie Saip Apoptose induziert, noch nicht geklärt ist, darf trotzdem anhand der vorgestellten Ergebnisse vermutet werden, daß Saip in der Vermittlung von proapoptotischen Signalen am endoplasmatischen Retikulum zusammen mit anderen Proteinen eine große Rolle spielt. Durch die Hochregulation von Saip durch apoptoseauslösende Reagenzien in verschiedenen Zelllinien, im Besonderen durch 5FU, könnte Saip eine Bedeutung in der Klinik, bei Tumoren die mit 5FU behandelt werden, zukommen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Der programmierte Zelltod (Apoptose), ist ein evolutiv konserviertes Selbstmordprogramm der Zelle, um auf äußere oder endogene Signale zu reagieren. Es dient dazu, überflüssige und/oder geschädigte Zellen zu entfernen. Dieser Prozess ist bei Krankheiten wie z.B. Krebs teilweise außer Kraft gesetzt, und bei Parkinson- oder Alzheimer-Erkrankung zu stark ausgeprägt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Gene biochemisch und molekularbiologisch näher charakterisiert. Bei diesen zwei Genen, die mit Hilfe eines speziell zur Identifikation dominanter, Apoptose-induzierender Gene entwickelten *Screeningsverfahrens* identifiziert wurden, handelt es sich um CybL, eine Komponente von Komplex II der Atmungskette, und um Saip (Small **a**poptosis inducing **p**rotein) einem Protein, das am endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist.

Bisher war bekannt, daß die Atmungskettenkomplexe I und III bei der Fas-Ligand und der Ceramid-vermittelten Apoptose beteiligt sind. Über einen Zusammenhang von Komplex II und Apoptose-Induktion war zu Beginn dieser Arbeit nichts beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde entdeckt, daß neben CybL kann auch noch die kleine Untereinheit von Komplex II (CybS) Apoptose auslösen kann, wohingegen die übrigen Komponenten von Komplex II, das Flavinprotein (FAD) und das Eisen-Schwefelprotein (FeS), nicht in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Die laut Datenbank vorhergesagten vier Transmembrandomänen von CybL sind für die apoptoseinduzierende Eigenschaft notwendig. Darüber hinaus führt nur eine 3,8-fache Induktion von CybL über dem endogenen CybL zu Apoptose in Säugetierzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, daß CybL einerseits bei Überexpression Apoptose induzieren kann, und andererseits Apoptose durch seine Inaktivierung reduziert wird. Daß CybL damit ein spezifischer Sensor für Apoptose ist, konnte dadurch ermittelt werden, daß eine Reihe verschiedener Apoptosestimuli (Doxorubicin, Etoposid, Menadion, Cisplatin, Taxol) und der Fas-Rezeptor einen intakten Komplex II zur Signalvermittlung benötigen. Dazu wurde mit sogenannten B9/B30 Zellen gearbeitet. B9/B30-Zellen sind Lungenfibroblasten aus Hamsterzellen, in denen CybL inaktiv ist (B9), wohingegen die B30-Zellen ein Fusionsprotein zwischen CybL und GFP enthalten,

welches die physiologische Aktivität von Komplex II wiederherstellt. In den B9-Zellen ist die Apoptoseinduktion durch Cytostatika (Ausnahme Arsentrioxid) bzw. durch den Fas-Rezeptor reduziert, verglichen mit den B30-Zellen. Auch Untersuchungen an HeLa WT- bzw. HeLa $\rho 0$ -Zellen (die keine intakte Atmungskette besitzen) zeigten, daß für die Apoptoseinduktion mit den oben genannten Reagenzien eine intakte Atmungskette benötigt wird.

Im Jahre 2000 wurde CybL als Tumorsuppressor beschrieben. Es ist daher zu vermuten, daß die Tumorsuppressor-Eigenschaften von CybL auf der Fähigkeit von Komplex II beruhen, proapoptotische Signale aufzunehmen und weiterleiten zu können.

Bisher war bekannt, daß eine transiente Inhibition einiger Atmungskettenkomplexe (Komplex I, II, III) zur Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) führt. Es konnte gezeigt werden, daß auch CybL bei Überexpression reaktive Sauerstoffintermediate produziert, und daß viele proapoptotische Signale zur spezifischen Inhibition von Komplex II führt. Da bereits eine geringe Expression von CybL ausreichend ist, um Komplex II zu inhibieren, und dadurch Apoptose ausgelöst wird, kann Komplex II als spezifischer Sensor für Apoptose angesehen werden.

Das bisher unbekannte Gen mit dem Namen Saip löst dominant Apoptose in Säugetierzellen aus. Die proapoptotische Eigenschaft von Saip ist vermutlich auf einen evolutiv konservierten Mechanismus zurückzuführen, da auch ein Homolog aus *C.elegans* nach transienter Transfektion in Säugerzellen Apoptose auslöst. Dabei induziert Saip Caspase-abhängige Apoptosewege, die zur Apoptose-typischen DNA-Fragmentierung und Bildung von apoptotischen Körperchen (Membran blebbing) führt.

Es konnte auch eine physikalische Protein-Proteininteraktion (mittels Co-Immunpräzipitation) mit Bap31 gefunden werden. Dieses Protein ist ebenfalls am ER lokalisiert und Bestandteil eines lokalen Apoptose-Sensors, der einen Proteinkomplex mit Procaspase-8L sowie antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie (Bcl-2 bzw. Bcl-X_L) bildet. Des weiteren interagiert Saip auch mit einer Deletionsmutante von Spike (**S**mall **p**rotein with **i**nherent **k**illing **e**ffect-Spike Δ N19), einem neuen proapoptotischen BH3-only Protein, das ebenfalls am ER lokalisiert ist, und an Bap31 bindet.

Saip ist ein ubiquitäres Protein und wird in sehr vielen der getesteten Gewebe und Zelltypen exprimiert. Im Northern-Blot-Verfahren konnte vergleichsweise eine hohe Expression an

humaner Saip-mRNA in Niere, Placenta, Herz, Leber, Dünndarm und Skelettmuskulatur detektiert werden.

Mit Hilfe von weiteren Northern-Blots wurde herausgefunden, daß Saip durch diverse Reagenzien, die bekanntermaßen Apoptose induzieren können, transkriptionell hochreguliert wird. So ist zum Beispiel das Signal von Saip nach 5-Fluorouracil-Behandlung (5FU), um das 80-fache gegenüber der Kontrolle erhöht. 5FU ist ein sehr effektives und bekanntes Zytostatikum, das in der Klinik zur Behandlung von Colon- und Mammakarzinomen erfolgreich eingesetzt wird. Wird Saip mittels der RNAi-Methode deaktiviert, wird die 5FU-induzierte Apoptose um 1/3 reduziert. Saip könnte somit eine wichtige Rolle in der Behandlung von Tumoren spielen, die mit 5FU therapiert werden.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\Delta\psi$	Membranpotenzial
μg	Mikrogramm
5FU	5Fluoruracil
Act.D	Actinomycin D
AIDS	Aquired immunodeficiency syndrome
AIF	Apoptosis-inducing factor
ANT	Adenine nucleotide translocator
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARMER	Apoptotic regulator in the endoplasmatic reticulum
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 agonist of cell death
Bak	Bcl-2 agonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X-factor
Bcl	B-cell lymphoma
BFA	Brefeldin A
BH-Domänen	Bcl-2 homology domains
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase recruitment domain
cDNA	complementary DNA
Ced	C. elegans death
CIDE	Cell death-inducing DFF45-like effector
COX	Cytochrom c Oxidase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DcR	Decoy-Rezeptoren
DD	Death domain
DED	Death Effector Domain
DFF	DNA fragmentation factor
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPD	Dihydropyrimidin Dehydrogenase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
Egl-1	Egg-laying defective
eIF	eukaryotic initiation factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence tag
EtBr	Ethdidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain protein
FasL	Fas-Ligand
FdUMP	Fluorodeoxyuridinmonophosphat
FdUTP	Fluorodeoxyuridintriphosphat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FLIP	FLICE (Caspase-8)–inhibitory protein
FUTP	Fluorouridintriphosphat
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-transferase
IAP	Inhibitory apoptosis proteins
ICAD	Inhibitor of CAD
ICE	Interleukin 1 β converting enzyme

IFN γ	Interferon gamma
InP ₃ R	Inositol 1,4,5,-triphosphaterezeptor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KSS	Kearns-Sayre syndrome
kV	Kilovolt
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MELAS	Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes
MEM	Minimum essential Medium
MERFF	Myoclonic epilepsy with ragged red fibers myoclonic epilepsy with ragged red fibers
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Milimolar
MMP	Mitochondriale Membranpermeabilisierung
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2,5)-diphenyl-
NaAc	Natriumacetat
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
nm	Nanometer
OD	Optische Diche
ORF	Open reading frame
PAK	Proteinkinase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PERK	PKR (RNA-activated protein kinase)-like endoplasmic reticulum kinase

PGL	Paragangliome
PMS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTP	Permeability transition pore
RAIP	Rapid apoptosis inducing protein
RING	Really interesting new gene
RNAi	RNA Interference
ROI	Reaktive Sauerstoffintermediate
Rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription und Polymerase-
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SERCA	Sarcoplasmatische/endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SMA	Spinal muscular atrophy
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
SMN	Survival motor neuron (gene)
SOD1	Superoxiddismutase
SOD2	Intramitochondriale Mangan-Superoxiddismutase
SOD3	Extrazelluläre CuZn-Dismutase
Spike	Small protein with inherhent killing effect
SSCP	Single-strand conformational polymorphism
tBid	truncated Bid
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
	Tetrazoliumbromid
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumor necrosis factor
TRADD	TNF receptor associated death domain protein
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand

TS	Thymidylatsynthase
TTFA	Thenoyltrifluoroacetone
ÜN	über Nacht
U	Unit
UPR	Unfolded protein response
UV	Ultraviolett
VDAC	Voltage-dependent anion channel
WT	Wildtyp
XIAP	X-chromosome linked IAP
z.B.	zum Beispiel
zVAD	fmk Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp- fluoromethylketone

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-1326.
- Albayrak , T. (2001). Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung von Cytochrom bL und Saip, zweier Apoptose-induzierender Gene. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ali, A., S. D. Mundle, D. Ragasa, S. Reza, V. Shetty, B. Y. Mativi, J. D. Cartlidge, M. Azharuddin, H. Qawi, S. Dar and A. Raza (1999). "Sequential activation of caspase-1 and caspase-3-like proteases during apoptosis in myelodysplastic syndromes." J Hematother Stem Cell Res **8**(4): 343-356.
- Altschul, S. F., M. S. Boguski, W. Gish and J. L. Wootton (1994). "Issues in searching molecular sequence database." Nature Genetics **6**: 119-129.
- Annis, M. G., N. Zamzami, W. Zhu, L. Z. Penn, G. Kroemer, B. Leber and D. W. Andrews (2001). "Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event." Oncogene **20**(16): 1939-1952.
- Aravind, L., V. M. Dixit and E. V. Koonin (1999). "The domains of death: evolution of the apoptosis machinery." Trends Biochem Sci **24**(2): 47-53.
- Arends, M. J., R. G. Morris and A. H. Wyllie (1990). "Apoptosis. The role of the endonuclease." Am J Pathol **136**(3): 593-608.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.

- Banerjee, D. and F. Slack (2002). "Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression." Bioessays **24**(2): 119-129.
- Bauer, M. K., A. Schubert, O. Rocks and S. Grimm (1999). "Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis." J Cell Biol **147**(7): 1493-1502.
- Baysal, B. E., R. E. Ferrell, J. E. Willett-Brozick, E. C. Lawrence, D. Myssiorek, A. Bosch, A. van der Mey, P. E. Taschner, W. S. Rubinstein, E. N. Myers, C. W. Richard, 3rd, C. J. Cornelisse, P. Devilee and B. Devlin (2000). "Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma." Science **287**(5454): 848-851.
- Bellomo, G., M. Perotti, F. Taddei, F. Mirabelli, G. Finardi, P. Nicotera and S. Orrenius (1992). "Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca²⁺ concentration and DNA fragmentation." Cancer Res **52**(5): 1342-1346.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-366.
- Bernstein, E., S. Y. Kim, M. A. Carmell, E. P. Murchison, H. Alcorn, M. Z. Li, A. A. Mills, S. J. Elledge, K. V. Anderson and G. J. Hannon (2003). "Dicer is essential for mouse development." Nat Genet **5**: 5.
- Birch-Machin, M. A., H. L. Briggs, A. A. Saborido, L. A. Bindoff and D. M. Turnbull (1994). "An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria." Biochem Med Metab Biol **51**(1): 35-42.

- Birnbaum, M. J., R. J. Clem and L. K. Miller (1994). "An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His seunce motifs." J. Virol. **68**: 2521-2528.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-731.
- Bojes, H. K., K. Datta, J. Xu, A. Chin, P. Simonian, G. Nunez and J. P. Kehrer (1997). "Bcl-x_L overexpression attentuates glutathione depletion in FL5.12 cells following interleukin-3 withdrawal." Biochem. J. **325**: 315-319.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev and D. Wallach (1995). "A novel protein that interacts with the death domain of Fas/Apo1 contains a sequence motif related to the death domain." J. Biol. Chem. **272**: 7795-7798.
- Bonilla, E., K. Tanji, M. Hirano, T. H. Vu, S. DiMauro and E. A. Schon (1999). "Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1410**(2): 171-182.
- Borner, C. and L. Monney (1999). "Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?" Cell Death Differ **6**(6): 497-507.
- Bosher, J. M. and M. Labouesse (2000). "RNA interference: genetic wand and genetic watchdog." Nat Cell Biol **2**(2): E31-36.
- Bouillet, P., D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams and A. Strasser (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science **286**(5445): 1735-1738.

- Bourdon, J. C., J. Renzing, P. L. Robertson, K. N. Fernandes and D. P. Lane (2002). "Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane." J Cell Biol **158**(2): 235-246.
- Bourgeron, T., P. Rustin, D. Chretien, M. Birch-Machin, M. Bourgeois, E. Viegas-Pequignot, A. Munnich and A. Rotig (1995). "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency." Nat Genet **11**(2): 144-149.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding." Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Breckenridge, D. G., M. Stojanovic, R. C. Marcellus and G. C. Shore (2003). "Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol." J Cell Biol **160**(7): 1115-1127.
- Brown, G. K. and M. V. Squier (1996). "Neuropathology and pathogenesis of mitochondrial diseases." J Inherit Metab Dis **19**(4): 553-572.
- Brummelkamp, T. R. and R. Bernards (2003). "New tools for functional mammalian cancer genetics." Nat Rev Cancer **3**(10): 781-789.
- Bucher, P. and A. BAIROCH (1994). "A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation." Proceedings of the 2nd ISMB Conference: 53-61.
- Cai, J. and D. P. Jones (1998). "Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss." J Biol Chem **273**(19): 11401-11404.

- Carson, D. A. and A. Lois (1995). "Cancer progression and p53." Lancet **346**(8981): 1009-1011.
- Cassarino, D. S. and J. P. Bennett, Jr. (1999). "An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration." Brain Res Brain Res Rev **29**(1): 1-25.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten and S. J. Korsmeyer (2001). "Bcl-2, bcl-x(l) sequester bh3 domain-only molecules preventing bax- and bak-mediated mitochondrial apoptosis." Mol Cell **8**(3): 705-711.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari and V. M. Dixit (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, G. L. Yu, R. H. Lyons, M. Garg, D. R. Duan, L. Xing, R. Gentz and J. D. Ni, V.M. (1996). "A novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis." Cell **81**: 505-512.
- Cikala, M., B. Wilm, E. Hobmayer, A. Bottger and C. N. David (1999). "Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra." Curr Biol **9**(17): 959-962.
- Cohen, J. J. and R. C. Duke (1984). "Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death." J Immunol **132**(1): 38-42.
- Cory, S., J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-656.

- Cryns, V. L., L. Bergeron, H. Zhu, H. Li and J. Yuan (1996). "Specific cleavage of α -fodrin during Fas. and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1 β -converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease." J. Biol. Chem. **271**: 31277-31282.
- Denault, J. B. and G. S. Salvesen (2002). "Caspases: keys in the ignition of cell death." Chem Rev **102**(12): 4489-4500.
- Deveraux, Q., R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases." Nature **388**: 300-303.
- Dorner, A., K. Schulze, U. Rauch and H. P. Schultheiss (1997). "Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function." Mol Cell Biochem **174**(1-2): 261-269.
- Duckett, C. S., V. E. Nava, R. W. Gedrich, R. J. Clem, J. L. Van Dongen, M. C. Gilfillan, H. Shiels, J. M. Hardwick and C. B. Thompson (1996). "A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors." Embo J **15**(11): 2685-2694.
- Eckert, A., U. Keil, C. A. Marques, A. Bonert, C. Frey, K. Schussel and W. E. Muller (2003). "Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease." Biochem Pharmacol **66**(8): 1627-1634.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.
- Elbeheti-Green, A., H. C. Au, J. T. Mascarello, D. Ream-Robinson and I. E. Scheffler (1998). "Characterization of the human SDHC gene encoding of the integral membrane proteins of succinate-quinone oxidoreductase in mitochondria." Gene **15**: 133-140.

- Ellerby, L. M., H. M. Ellerby, S. M. Park, A. L. Holleran, A. N. Murphy, G. Fiskum, D. J. Kane, M. P. Testa, C. Kayalar and D. E. Bredesen (1996). "Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2." Neurochem. **67**: 1259-1267.
- Ellis, H. M., H. R. Horvitz, S. J. Korsmeyer, A. Gross, H. Harada, J. Zha, K. Wang, X. M. Yin, M. Wei, S. Zinkel, K. M. Boatright and G. S. Salvesen (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*." Cell **44**(6): 817-829.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Fesus, L., V. Thomazy, F. Autuori, M. P. Ceru, E. Tarcsa and M. Piacentini (1989). "Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action." FEBS Lett **245**(1-2): 150-154.
- Fjose, A., S. Ellingsen, A. Wargelius and H. C. Seo (2001). "RNA interference: mechanisms and applications." Biotechnol Annu Rev **7**: 31-57.
- Flint, M. and J. A. McKeating (2000). "The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection." Rev Med Virol **10**(2): 101-117.
- Florence, W. H. N. and G. Shore (1998). "Bcl-X_L Cooperatively Associates with the Bap31 Complex in the Endoplasmic Reticulum, Dependent on Procaspase-8 and Ced-4 Adaptor." J. Biol. Chem. **273**: 3140-3143.
- Foghsgaard, L., D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist and M. Jaattela (2001). "Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor." J Cell Biol **153**(5): 999-1010.

- Foyouzi-Youssefi, R., S. Arnaudeau, C. Borner, W. L. Kelley, J. Tschopp, D. P. Lew, N. Demaurex and K. H. Krause (2000). "Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5723-5728.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." Annu Rev Biochem **64**: 97-112.
- Gardner, P. R., I. Raineri, L. B. Epstein and C. W. White (1995). "Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells." J Biol Chem **270**(22): 13399-13405.
- Gawaz, W. (1990). "A method for isolating mitochondria." Journal of Biologic Chemistry **265**: 14202.
- Gelfanov, V. M., G. S. Burgess, S. Litz-Jackson, A. J. King, M. S. Marshall, H. Nakshatri and H. S. Boswell (2001). "Transformation of interleukin-3-dependent cells without participation of Stat5/bcl-xL: cooperation of akt with raf/erk leads to p65 nuclear factor kappaB-mediated antiapoptosis involving c-IAP2." Blood **98**(8): 2508-2517.
- Giacchetti, S., B. Perpoint, R. Zidani, N. Le Bail, R. Faggiuolo, C. Focan, P. Chollet, J. F. Llory, Y. Letourneau, B. Coudert, F. Bertheaut-Cvitkovic, D. Larregain-Fournier, A. Le Rol, S. Walter, R. Adam, J. L. Misset and F. Levi (2000). "Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **18**(1): 136-147.
- Gooch, J. L. and D. Yee (1999). "Strain-specific differences in formation of apoptotic DNA ladders in MCF-7 breast cancer cells." Cancer Lett **144**(1): 31-37.
- Gosden, R. and N. Spears (1997). "Programmed cell death in the reproductive system." Br Med Bull **53**(3): 644-661.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5." Virology **54**(2): 536-539.

- Green, D. R. (1998). "Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin." Cell **94**: 695-698.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-1312.
- Grimm, S. and P. Leder (1997). "An apoptosis-inducing isoform of neu differentiation factor (NDF) identified using a novel screen for dominant, apoptosis-inducing genes." J Exp Med **185**(6): 1137-1142.
- Grimm, S., E. J. Weinstein, I. M. Krane and P. Leder (1998). "Neu differentiation factor (NDF), a dominant oncogene, causes apoptosis in vitro and in vivo." J Exp Med **188**(8): 1535-1539.
- Gross, A., J. M. McDonnell and S. J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-1911.
- Gudz T. I., Tserng K. Y., Hoppel C. L. (1997). "Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide." J Biol Chem. 272(39):24154-24158.
- Hacki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay and C. Borner (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**(19): 2286-2295.
- Hakem, R., A. Hakem, G. S. Duncan, J. T. Henderson, M. Woo, M. S. Soengas, A. Elia, J. L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S. A. Kaufman, S. W. Lowe, J. M. Penninger and T. W. Mak (1998). "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo." Cell **94**(3): 339-352.
- Hamman, S. R. (1994). "Mitochondrial DNA and disease." Essays Biochem **28**: 99-112.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Hansen, M. B., S. E. Nielsen and K. Berg (1989). "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill." J Immunol Methods **119**(2): 203-210.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-251.
- Hatefi, Y. (1978). "Resolution of complex II and isolation of succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1)." Methods Enzymol **53**: 27-35.
- Hengartner, M. O. (1994). "Programmed cell death. A rich harvest." Curr Biol **4**(10): 950-952.
- Hengartner, M. O. (2001a). "Apoptosis. DNA destroyers." Nature **412**(6842): 27, 29.
- Hengartner, M. O. (2001b). "Apoptosis: corralling the corpses." Cell **104**(3): 325-328.
- Hengartner, M. O., R. E. Ellis and H. R. Horvitz (1992). "Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death." Nature **356**(6369): 494-499.
- Higuchi, M., R. J. Proske and E. T. Yeh (1998). "Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis." Oncogene **17**(19): 2515-2524.
- Hu, W. L., Y. Q. Li, H. X. He, Q. R. Li, Y. Tian, R. Q. Lai and H. Mei (2000). "KAI1/CD82 gene expression in benign prostatic hyperplasia and late-stage prostate cancer in Chinese." Asian J Androl **2**(3): 221-224.
- Hussain, S. P. and C. C. Harris (2000). "Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens." Mutat Res **462**(2-3): 311-322.

- Inohara, N., T. Koseki, S. Chen, X. Wu and G. Nunez (1998). "CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor." Embo J **17**(9): 2526-2533.
- Inohara, N. and G. Nunez (2000). "Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish." Cell Death Differ **7**(5): 509-510.
- Ishii, H. H., M. R. Etheridge and G. C. Gobe (1995). "Cycloheximide-induced apoptosis in Burkitt lymphoma (BJA-B) cells with and without Epstein-Barr virus infection." Immunol Cell Biol **73**(5): 463-468.
- Iwahashi, H., Y. Eguchi, N. Yasuhara, T. Hanafusa, Y. Matsuzawa and Y. Tsujimoto (1997). "Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy." Nature **390**(6658): 413-417.
- Jaattela, M. (2002). "Programmed cell death: many ways for cells to die decently." Ann Med **34**(6): 480-488.
- Jacobson, M. D. and M. C. Raff (1995). "Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen." Nature **374**(6525): 814-816.
- Jamora, C., G. Dennert and A. S. Lee (1996). "Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7690-7694.
- Jiang, S., J. Cai, D. C. Wallace and D. P. Jones (1999). "Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved." J Biol Chem **274**(42): 29905-29911.
- Johnson, S., M. Michalak, M. Opas and P. Eggleton (2001). "The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space." Trends Cell Biol **11**(3): 122-129.

- Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer and J. M. Penninger (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-554.
- Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner and P. Golstein (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." Science **265**(5171): 528-530.
- Kaufmann, S. H. and M. O. Hengartner (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium." Trends Cell Biol **11**(12): 526-534.
- Kelly, W. G. and A. Fire (1998). "Chromatin silencing and the maintenance of a functional germline in *Caenorhabditis elegans*." Development **125**(13): 2451-2456.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br. J. Cancer **26**(4): 239-257.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann and M. Germer (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC)." Embo J **14**(22): 5579-5588.
- Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott and A. Ashkenazi (2001). "Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8." J Biol Chem **276**(49): 46639-46646.
- Koreth, J., C. J. Bakkenist and J. O. McGee (1999). "Chromosomes, 11Q and cancer: a review." J. Pathol. **187**: 28.

- Krajewski, S., C. Blomqvist, K. Franssila, M. Krajewska, V. M. Wasenius, E. Niskanen, S. Nordling and J. C. Reed (1995). "Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma." Cancer Res **55**(19): 4471-4478.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-795.
- Kroemer, G., P. Petit, N. Zamzami, J.-L. Vayssière and B. Mignotte (1995). "The biochemistry of programmed cell death." FASEB J. **9**: 1277-1287.
- Kroemer, G., N. Zamzami and S. A. Susin (1997). "Mitochondrial control of apoptosis." Immunol Today **18**(1): 44-51.
- Kuida, K., T. F. Haydar, C. Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M. S. Su, P. Rakic and R. A. Flavell (1998). "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9." Cell **94**(3): 325-337.
- Kuida, K., T. S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic and R. A. Flavell (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice." Nature **384**(6607): 368-372.
- Kumar, S. (1999). "Mechanisms mediating caspase activation in cell death." Cell Death Differ **6**(11): 1060-1066.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T8." Nature **227**: 680-685.

- Landschulz, W. H., P. F. Johnson and S. L. McKnight (1988). "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." Science **240**: 1759-1764.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-16.
- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw (1994). "Cleavage of poly (ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE." Nature **371**: 346-347.
- Lebovitz, R. M., H. Zhang, H. Vogel, J. Cartwright, Jr., L. Dionne, N. Lu, S. Huang and M. M. Matzuk (1996). "Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9782-9787.
- Levenson, A. S. and V. C. Jordan (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line." Cancer Res **57**(15): 3071-3078.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
- Li, P., H. Allen, S. Banerjee, S. Franklin, L. Herzog, C. Johnston, J. McDowell, M. Paskind, L. Rodman, J. Salfeld and et al. (1995). "Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock." Cell **80**(3): 401-411.
- Lindsten, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan and S. J. Korsmeyer (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-1399.

- Liston, P., N. Roy, K. Tamai, C. Lefebvre, S. Baird, G. Cherton Horvat, R. Farahani, M. McLean, J. E. Ikeda, A. MacKenzie and R. G. Korneluk (1996a). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." Nature **379**: 349-353.
- Liston, P., N. Roy, K. Tamai, C. Lefebvre, S. Baird, G. Cherton-Horvat, R. Farahani, M. McLean, J. E. Ikeda, A. MacKenzie and R. G. Korneluk (1996b). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." Nature **379**(6563): 349-353.
- Liu, M. C., E. P. Gelmann, G. S. Salvesen and C. S. Duckett (2002). "P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors." Semin Oncol **29**(3): 246-257.
- Liu, X., H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1997). "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." Cell **89**(2): 175-184.
- Lockshin, R. A. and J. Beaulaton (1981). "Cell death: questions for histochemics concerning the causes of the various cytological changes." Histochem. J. **13**: 659-666.
- Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
- Loeffler, M. and G. Kroemer (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." Exp Cell Res **256**(1): 19-26.
- Longley, D. B., D. P. Harkin and P. G. Johnston (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." Nat Rev Cancer **3**(5): 330-338.
- Lui, H. M., J. Chen, L. Wang and L. Naumovski (2003). "ARMER, Apoptotic Regulator in the Membrane of the Endoplasmic Reticulum, A Novel Inhibitor of Apoptosis." Mol Cancer Res **1**(7): 508-518.

- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-490.
- Lupas, e. a. (1996). "Algorithm for Coiled-coil Structures."
- Lüthy, R., I. Xenarios and P. Bucher (1994). "Improving the sensitivity of sequence profile method." Prot. Sci. **3**: 139-146.
- Martin, S. J., D. R. Green and T. G. Cotter (1994). "Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery." Trends Biochem Sci **19**(1): 26-30.
- Martinou, J. C. and D. R. Green (2001a). "Breaking the mitochondrial barrier." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 63-67.
- Martinou, J. C. and D. R. Green (2001b). "Breaking the mitochondrial barrier." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 63-67.
- McConkey, D. J., P. Nicotera, P. Hartzell, G. Bellomo, A. H. Wyllie and S. Orrenius (1989). "Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration." Arch Biochem Biophys **269**(1): 365-370.
- McCullough, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw and N. J. Holbrook (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state." Mol Cell Biol **21**(4): 1249-1259.
- McLaughlin, R., C. J. Kelly, E. Kay and D. Bouchier-Hayes (2001). "The role of apoptotic cell death in cardiovascular disease." Ir J Med Sci **170**(2): 132-140.
- McNew, J. A. and J. M. Goodman (1996). "The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply." Trends in Biochem. Sci. **21**: 54.

- Meier, P., A. Finch and G. Evan (2000). "Apoptosis in development." Nature **407**(6805): 796-801.
- Milligan, C. E. and L. M. Schwartz (1997). "Programmed cell death during animal development." Br Med Bull **53**(3): 570-590.
- Mirkovic, N., D. W. Voehringer, M. D. Story, D. J. McConkey, T. J. McDonnell, R. E. Meyn and M. G. Grutter (1997). "Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols." Oncogene **15**: 1461-1470.
- Miyake, H., I. Hara, S. Arakawa and S. Kamidono (2000). "Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells." J Cell Biochem **77**(3): 396-408.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-299.
- Mund, T., A. Gewies, N. Schoenfeld, M. K. Bauer and S. Grimm (2003). "Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum." Faseb J **17**(6): 696-698.
- Muschen, M. Warskulat, U., and Beckmann, M.W. (2000). Defining CD95 as a tumor suppressor gene. J. Mol. Med. **78**: 312-325
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter and V. M. Dixit (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous Ice/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex." Cell **85**: 817-827.

- Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." Exp Cell Res **256**(1): 12-18.
- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." Science **267**(5203): 1449-1456.
- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner and J. Yuan (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β ." nature **403**: 98-103.
- Neudecker, F. and S. Grimm (2000). "High-throughput method for isolating plasmid DNA with reduced lipopolysaccharide content." Biotechniques **28**(1): 107-109.
- Newmeyer, D. D., D. M. Farschon and J. C. Reed (1994). "Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria." Cell **79**(2): 353-364.
- Ng, F. W., M. Nguyen, T. Kwan, P. E. Branton, D. W. Nicholson, J. A. Cromlish and G. C. Shore (1997). "p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **139**(2): 327-338.
- Ng, F. W. and G. C. Shore (1998). "Bcl-XL cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor." J Biol Chem **273**(6): 3140-3143.
- Nguyen, M., A. D. Breckenridge and G. C. Shore (2000a). "Caspase-Resistant BAP31 Inhibits Fas-Mediated Apoptotic membrane Fragmentation and Release of Cytochrome c from Mitochondria." Molecular and Cellular Biology **20**: 6731-6740.
- Nguyen, M., D. G. Breckenridge, A. Ducret and G. C. Shore (2000b). "Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria." Mol Cell Biol **20**(18): 6731-6740.

- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997). "Caspases: killer proteases." Trends Biochem Sci **22**(8): 299-306.
- Niemann, S. and U. Muller (2000). "Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3." Nat Genet **26**(3): 268-270.
- Ohtsuki, K., T. Sato, T. Koike, K. Koyama and N. Ishida (1981). "The inhibitory mechanism of in vitro protein phosphorylation by a nonprotein chromophore removed from neocarzinostatin." Biochim Biophys Acta **673**(2): 147-156.
- Oostveen, F. G., H. C. Au, P. J. Meijer and I. E. Scheffler (1995). "A Chinese hamster mutant cell line with a defect in the integral membrane protein CII-3 of complex II of the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem **270**(44): 26104-26108.
- Oren, M. (1999). "Regulation of the p53 tumor suppressor protein." J Biol Chem **274**(51): 36031-36034.
- Orth, K., K. O'Rourke, G. S. Salvesen and V. M. Dixit (1996). "Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases." J. Biol. Chem. **271**: 20977-20980.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy and G. J. Hannon (2002). "Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1443-1448.
- Patil, C. and P. Walter (2001). "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 349-355.
- Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1991). "Determination of 3-hydroxykynurenine in human brain and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Increased concentrations in hepatic encephalopathy." J Chromatogr **565**(1-2): 436-440.

- Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1992). "Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease." Neurosci Lett **144**(1-2): 199-201.
- Peitsch, M. C., H. G. Mannherz and J. Tschopp (1994). "The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?" Trends Cell Biol. **4**: 37-41.
- Petit, P. X., N. Zamzami, J. L. Vayssiere, B. Mignotte, G. Kroemer and M. Castedo (1997). "Implication of mitochondria in apoptosis." Mol Cell Biochem **174**(1-2): 185-188.
- Pinna, L. A. (1990). "Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation?" Biochim. Biophys. Acta **1054**: 267-284.
- Pitti, R. M., S. A. Marsters, D. A. Lawrence, M. Roy, F. C. Kischkel, P. Dowd, A. Huang, C. J. Donahue, S. W. Sherwood, D. T. Baldwin, P. J. Godowski, W. I. Wood, A. L. Gurney, K. J. Hillan, R. L. Cohen, A. D. Goddard, D. Botstein and A. Ashkenazi (1998). "Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer." Nature **396**(6712): 699-703.
- Polyak, K., Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1997). "A model for p53-induced apoptosis." Nature **389**(6648): 300-305.
- Poulton, J. (1988). "Mitochondrial DNA and genetic disease." Arch Dis Child **63**(8): 883-885.
- Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**(6368): 397-400.
- Razzini, G., C. P. Berrie, S. Vignati, M. Brogini, G. Mascetta, A. Brancaccio and M. Falasca (2000). "Novel functional PI 3-kinase antagonists inhibit cell growth and tumorigenicity in human cancer cell lines." Faseb J **14**(9): 1179-1187.

- Raha S, McEachern GE, Myint AT, Robinson BH. (2000). „Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase.“ Free Radic Biol Med. **29**(2):170-180.
- Reed, J. C., J. M. Jurgensmeier and S. Matsuyama (1998). "Bcl-2 family proteins and mitochondria." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 127-137.
- Rehm, M., H. Dussmann, R. U. Janicke, J. M. Tavaré, D. Kogel and J. H. Prehn (2002). "Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process." J Biol Chem **277**(27): 24506-24514.
- Renard, L., C. Godfraind, L. M. Boon and M. Vikkula (2003). "A novel mutation in the SDHD gene in a family with inherited paragangliomas--implications of genetic diagnosis for follow up and treatment." Head Neck **25**(2): 146-151.
- Ricci, J. E., R. A. Gottlieb and D. R. Green (2003). "Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis." J Cell Biol **160**(1): 65-75.
- Rothe, M., M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres and D. V. Goeddel (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." Cell **83**(7): 1243-1252.
- Rotonda, J., D. W. Nicholson, K. M. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, E. P. Peterson, D. M. Rasper, R. Ruel, J. P. Vaillancourt, N. A. Thornberry and J. W. Becker (1996). "The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis." Nat Struct Biol **3**(7): 619-625.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. s. Salvesen and J. C. Reed (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." EMBO J. **16**: 6914-6925.

- Salvesen, G. S., M. Renatus (2002). "Apoptosome: the seven-spoked death machine." Dev Cell **2**(3): 256-257.
- Sambrook, J., R. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.
- Sardar, A. M., J. E. Bell and G. P. Reynolds (1995). "Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of HIV-1-positive patients." J Neurochem **64**(2): 932-935.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, P. H. Krammer and M. E. Peter (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." J Biol Chem **274**(3): 1541-1548.
- Schmidt, D.M., saghbini, M,m and Scheffler, I.E. (1992). The C-terminus of the succinate dehydrogenase IP peptide of *Saccharomyces cerevisiae* is significant for assembly of complex II. Biochemistry **31**: 8442-8448
- Schultheiss, H. P., K. Schulze and A. Dorner (1996). "Significance of the adenine nucleotide translocator in the pathogenesis of viral heart disease." Mol Cell Biochem **163-164**: 319-327.
- Senoo-Matsuda, N., K. Yasuda, M. Tsuda, T. Ohkubo, S. Yoshimura, H. Nakazawa, P. S. Hartman and N. Ishii (2001). "A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*." J Biol Chem **276**(45): 41553-41558.
- Shi, Y. (2002). "Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9." Structure (Camb) **10**(3): 285-288.
- Simonian, N. A. and B. T. Hyman (1994). "Functional alterations in Alzheimer's disease: selective loss of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase mRNA in the hippocampal formation." J Neuropathol Exp Neurol **53**(5): 508-512.

- Simstein, R., M. Burow, A. Parker, C. Weldon and B. Beckman (2003). "Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system." Exp Biol Med (Maywood) **228**(9): 995-1003.
- Slee, E. A., M. T. Harte, R. M. Kluck, B. B. Wolf, C. A. Casiano, D. D. Newmeyer, H. G. Wang, J. C. Reed, D. W. Nicholson, E. S. Alnemri, D. R. Green and S. J. Martin (1999). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." J Cell Biol **144**(2): 281-292.
- Song, Q., S. P. Lees Miller, S. Kumar, Z. Zhang, D. W. Chan, G. C. Smith, S. P. Jackson, E. S. Alnemri, G. Litwack, K. K. Khanna and M. F. Lavin (1996). "DN-a-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis." EMBO J **15**: 3238-3246.
- Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi and E. S. Alnemri (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**(6824): 112-116.
- Strasser, A., A. W. Harris, M. L. Bath and S. Cory (1990). "Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2." Nature **348**(6299): 331-333.
- Strasser, A., D. C. Huang and D. L. Vaux (1997). "The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy." Biochim Biophys Acta **1333**(2): F151-178.
- Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-245.

- Suno, M. and A. Nagaoka (1984). "Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound (CV-2619) in brain mitochondria and mode of action of the inhibition." Biochem Biophys Res Commun **125**(3): 1046-1052.
- Susin, S. A., E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw and G. Kroemer (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis." J Exp Med **192**(4): 571-580.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, C. Brenner, N. Larochette, M. C. Prevost, P. M. Alzari and G. Kroemer (1999). "Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process." J Exp Med **189**(2): 381-394.
- Suzuki, Y., Y. Ono and Y. Hirabayashi (1998). "Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis." FEBS Lett **425**(2): 209-212.
- Takahashi, A., E. S. Alnemri, Y. A. Lazebnik, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, R. D. Moir, R. D. Goldman, G. G. Poirier, S. H. Kaufmann and W. C. Earnshaw (1996). "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8395-8400.
- Tatton, W. G., R. Chalmers-Redman, D. Brown and N. Tatton (2003). "Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation." Ann Neurol **53**(Suppl 3): S61-70; discussion S70-62.
- Tatton, W. G. and R. M. Chalmers-Redman (1998). "Mitochondria in neurodegenerative apoptosis: an opportunity for therapy?" Ann Neurol **44**(3 Suppl 1): S134-141.
- Tatusova, T. A. and T. L. Madden (1999). "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences." FEMS Microbiol. Lett. **174**: 247-250.

- Thome, M., P. Schneider, K. ofmann, H. Fickenscher, E. Meinl, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter and J. Tschopp (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**: 517-521.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-1462.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-1316.
- Towler, D. A., J. I. Gordon, S. P. Adams and L. Glaser (1988). "The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation." Annu. Rev. Biochem. **57**: 69-99.
- Trump, B. F. and R. E. Bulger (1967). "Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. I. Correlation between morphology and function of control tubules and observations of autophagocytosis and mechanical cell damage." Lab Invest **16**(3): 453-482.
- Trumpower, B. L. (1990). "The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex." J Biol Chem **265**(20): 11409-11412.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2000). "VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins." Cell Death Differ **7**(12): 1174-1181.
- Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel and P. A. Sharp (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." Genes Dev **13**(24): 3191-3197.
- van der Mey, A. G., P. D. Maaswinkel-Mooy, C. J. Cornelisse, P. H. Schmidt and J. J. can de Kamp (1989). "Genomic imprinting in hereditary glomus tumours: evidence for new genetic theory." Lancet **2**: 1291.

- van Loo, G., M. van Gurp, B. Depuydt, S. M. Srinivasula, I. Rodriguez, E. S. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis." Cell Death Differ **9**(1): 20-26.
- Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, V. Luria, N. Chiannilkulchai, J. S. Beckmann, I. L. Mett, D. Rebrikov, V. M. Brodianski, O. C. Kemper, O. Kollet, T. Lapidot, D. Soffer, T. Sobe, K. B. Avraham, T. Goncharov, H. Holtmann, P. Lonai and D. Wallach (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally." Immunity **9**(2): 267-276.
- Vermes, I., C. Haanen and C. Reutelingsperger (2000). "Flow cytometry of apoptotic cell death." J Immunol Methods **243**(1-2): 167-190.
- Vila, M. and S. Przedborski (2003). "Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **4**(5): 365-375.
- Vinogradoc, A. D., V. G. Gavrikov and E. V. Gavrikoba (1980). "Studies on the succinate dehydrogenating system II. Reconstitution of succinate-ubiquinone reductase from hte soluble components." Biochm. Biophys. Acta **592**: 13-27.
- Voll, R. E., M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden and I. Girkontaite (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.
- Wagenknecht, B., W. Roth, E. Gulbins, H. Wolburg and M. Weller (2001). "C2-ceramide signaling in glioma cells: synergistic enhancement of CD95-mediated, caspase-dependent apoptosis." Cell Death Differ **8**(6): 595-602.
- Walker, N. P., R. V. Talanian, K. D. Brady, L. C. Dang, N. J. Bump, C. R. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, M. C. Hackett, L. D. Hammill and et al. (1994). "Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer." Cell **78**(2): 343-352.

- Wallach, D. (1997). "Placing death under control." Nature **388**: 123-126.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and S. Nagata (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." Nature **356**(6367): 314-317.
- Waterhouse, N. J., J. C. Goldstein, O. von Ahsen, M. Schuler, D. D. Newmeyer and D. R. Green (2001). "Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process." J Cell Biol **153**(2): 319-328.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, S. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-730.
- Welihinda, A. A., W. Tirasophon and R. J. Kaufman (1999). "The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum." Gene Expr. **7**: 293-300.
- Whitlock, B. B., S. Gardai, V. Fadok, D. Bratton and P. M. Henson (2000). "Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms." J Cell Biol **151**(6): 1305-1320.
- Wilson, K. P., J. A. Black, J. A. Thompson, E. E. Kim, J. P. Griffith, M. A. Navia, M. A. Murcko, S. P. Chambers, R. A. Aldape and S. A. Raybuck (1994). "Structure and mechanism of interleukin-1-b-converting enzyme." Nature **370**: 270-275.
- Wilson, R. e. a. (1994). "2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*." Nature **368**: 32-38.

- Wohlhueter, R. M., R. S. McIvor and P. G. Plagemann (1980). "Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells." J Cell Physiol **104**(3): 309-319.
- Xiang, J., D. T. Chao and S. J. Korsmeyer (1996). "BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14559-14563.
- Xu, D. G., S. J. Crocker, J. P. Doucet, M. St-Jean, K. Tamai, A. M. Hakim, J. E. Ikeda, P. Liston, C. S. Thompson, R. G. Korneluk, A. MacKenzie and G. S. Robertson (1997). "Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus." Nat Med **3**(9): 997-1004.
- You, M., P. T. Ku, R. Hrdlickova and H. R. Bose, Jr. (1997). "ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein." Mol Cell Biol **17**(12): 7328-7341.
- Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssiere, P. X. Petit and G. Kroemer (1995). "Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo." J Exp Med **181**(5): 1661-1672.
- Zong, W. X., T. Lindsten, A. J. Ross, G. R. MacGregor and C. B. Thompson (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." Genes Dev **15**(12): 1481-1486.
- Zoratti, M. and I. Szabo (1994). "Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane." J Bioenerg Biomembr **26**(5): 543-553.
- Zornig, M., A. Hueber, W. Baum and G. Evan (2001). "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis." Biochim Biophys Acta **1551**(2): F1-37.

Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg and X. Wang (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to C.elegans Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of capase-3." Cell **90**: 405-413.

Lebenslauf

Name:	SCHERHAMMER Volker-Christof	
Geboren:	24.11.1973 in Salzburg	
Nationalität:	Österreich	
Wohnhaft:	Johann-Clanzestr. 43; 81369 München	
Schulausbildung:	1980-1984:	Volksschule in Bad-Ischl (Oberösterreich)
	1984-1992:	Bundesrealgymnasium in Bad-Ischl
Abitur:	Juni 1992	
Hochschulreife:	1992-1994:	Studium der Medizin an der Universität Innsbruck
	1994-2000:	Studium der Biologie (Studienzweig Genetik) an der Naturwissenschaftlichen Fakultät Salzburg
Diplomarbeit:	10/1998 –5/2000:	an den Landeskliniken für Kinder- & Jugendheilkunde Salzburg (Prof. Dr. Wolfgang Sperl)
	Thema:	„Der mitochondriale DNA-Gehalt als Ausdruck für die Energieversorgung von pathologisch veränderten Geweben.“
Diplomprüfung:	Mai 2000	Hauptfach: Biochemie/Immunologie Nebenfach: Tumoriologie
	05/2000-02/2001:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an den Landeskliniken für Kinder-& Jugendheilkunde
Promotion:	2001-2004:	Ludwigs-Maximilians-Universität München (LMU)und Max-Planck-Institut für Biochemie Arbeitsgruppe Dr. Stefan Grimm: „Programmierter Zelltod“ (Apoptose)

Veröffentlichungen

The tumor suppressor cybL, a component of the respiratory chain, mediates apoptosis induction. Mol Biol Cell. 2003 Aug;14(8):3082-96. Epub 2003 May 18
Scherhammer V*, Albayrak T*, Schoenfeld N, Braziulis E, Mund T, Bauer MK, Scheffler IE, Grimm S.

* Gleichberechtigte Erstautoren